

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1921-1922 -:- N° 9

Sur le pouvoir antidiastasique du Sérum Sanguin

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 27 Juin 1922

par

A. FALQUE

Pharmacien de 1^{re} classe, Interne des Hopitaux de Paris

JURY	{	COUTIÈRE, <i>Président.</i>
		RADAIS, <i>Professeur.</i>
		LAUNOY, <i>Agrégé.</i>

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1921-1922 -:- N° 9

Sur le pouvoir antidiastasique du Sérum Sanguin

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 27 Juin 1922

par

A. FALQUE

Pharmacien de 1^{re} classe, Interne des Hopitaux de Paris

JURY

} COUTIÈRE, *Président.*
RADAIS, *Professeur.*
LAUNOY, *Agrégé.*



Personnel de la Faculté de Pharmacie

Administration

MM. H. GAUTIER, *Doyen*, O, *, Q I.
RADAIS, *Assesseur*, *, Q I.
G. DURSANT, *Secrétaire*, *, Q I.

Professeurs

MM.	GUIGNARD, Membre de l'Institut, C, *, Q I.	Botanique Générale.
	VILLIERS, *, Q I.	Chimie analytique.
	H. GAUTIER, O, *, Q I.	Chimie minérale
	RADAIS, *, Q I.	Cryptogamie.
	BEHAL, Membre de l'Institut, C, *, Q I.	Chimie organique.
	PERROT, O, *, Q I.	Histoire naturelle des médicaments.
	COUTIERE, *, Q I.	Zoologie.
	BERTHELOT, Membre de l'Institut, Q I.	Physique.
	GRIMBERT, *, Q I.	Chimie biologique.
	LEBEAU, O, *, Q I.	Pharmacie chimique.
	GUERBET, Q I.	Toxicologie.
	DELEPINE, *, Q I.	Hydrologie et Hygiène.
	BOUGAULT, Q I.	Pharmacie galénique.

Doyen honoraire : M. GUIGNARD, C, *, Q I.
Professeur honoraire : M. MOREAU, O, *, Q I.

Chargés de cours

MM.	TASSILLY, *, Q I.	Minérlogie.
	Marc HONNORAT, *, Q I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
	GUERIN, Q I.	Cryptogamie.

Agrégés en exercice

MM.	SOMMELET, Q I.	MM.	GUERIN, Q I.	MM.	LAUNOY, *, QA.
	DAMIENS, QA.		LUTZ, Q I.		HERISSEY, *, Q I.
	TASSILLY, *, Q I.		GORIS, *, Q I.		

Chefs des travaux pratiques

MM.	DEFACQZ, *, Q I.	Chimie générale.
	COUSIN, Q I.	Chimie analytique.
	SOUEGES, QA.	Micrographie
	LEROUX, Q I.	Physique.
	DEVAL, Q I.	Microbiologie.
	JAVILLIER, *, Q I.	Travaux généraux de 4 ^e année.

Chef du Laboratoire des Examens pratiques : M. JAVILLIER, *, Q I.
Bibliothécaire en chef : M. DORVEAUX, Q I.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROUX

Directeur de l'Institut Pasteur

Respectueux hommage.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur H. COUTIÈRE

Sentiment de vive gratitude.

A MON MAITRE

Monsieur le Professeur Agrégé L. LAUNOY

*Témoignage de profonde
reconnaissance.*

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

AUX MIENS ET A TOUS MES AMIS

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
Table des matières	I - III
Introduction	IV-V

PREMIÈRE PARTIE

Action antidiastatique du sérum (*sérum normal et sérum préparé*)
(Historique. Mise en évidence du pouvoir empêchant. Techniques.
Spécificité de l'antiferment d'immunisation).

CHAPITRE I

Action empêchante du sérum sur les diastases coagulantes

PRESURES animales	1
— végétales.	3
FIBRIN-FERMENT	7

CHAPITRE II

Action empêchante du sérum sur les diastases hydrolysantes

a) Des matières protéiques.

PEPSINE	8
PAPAÏNE	12
TRYPSINE. § I. Méthodes de METT	13
— de MÜLLER & JOCHMANN	14
— de GROSS-FULD, à la caséine	17
— d'ACHALME, au lait.	19
— de FERMI, à la gélatine	21
§ II. Méthodes physiques basées sur la viscosité.	22
— — — la conductibilité électrique	23
— — — la réfractométrie.	23
§ III. Critique de ces méthodes	27
§ IV. Exposé de la méthode de L. LAUNOY	28
PROTEASE LEUCOCYTAIRE.	40
ACTION ET AMIBODIASTASES.	40
PROTEASES MICROBIENNES (Cf. Chapitre spécial).	

b) Des produits de leur dédoublement.

UREASE animale	41
— végétale	42

c) Des sucres et des glucosides.

AMYLASE (dextrinase).	43
EMULSINE,	44

CHAPITRE III

Action empêchante du sérum sur les diastases oxydantes.

OXYDASES	45
TYROSINASE (végétale),	45
— (animale).	47
LACCASE	47
PEROXYDASES	48

DEUXIÈME PARTIE

Caractères physico-chimiques et nature biologique de l'action antidiastatique du sérum (en particulier de l'action antitryptique).

CHAPITRE I

Caractères physiques et chimiques.

Action du temps	49
— de la température	50
— des rayons ultra-violets - Agitation	52
— de la dialyse	53
Influence du contact avec le noir animal, le collodion, etc.	53
Action des acides et des bases. Agents destructeurs	54

CHAPITRE II

Rapport des propriétés antidiastatiques avec les constituants du sérum. - Nature des antiferments.

Influence de la réaction, des sels du sérum, des produits de dédoublement des matières protéiques	55
Action des lipoides. - Théories de SCHWARZ et JOBLING. - Discussion.	56
Action des protéines du sérum. - Nature protéique de la substance empêchante	59

CHAPITRE III

Mécanisme de l'action antidiastatique.

Théorie physico-chimique (HEDIN, GENGOU, V. HENRI, ISCOVESCO).	61
Les antiferments considérés comme anticorps	63

TROISIÈME PARTIE

Etude des modifications du pouvoir antifermentaire du sérum et des causes de ces variations.

CHAPITRE I

Variations physiologiques.

Age.	65
Grossesse - Accouchement	66
Digestion - Alimentation	66
Jeûne - Inanition	67

CHAPITRE II

Variations au cours de processus pathologiques.

Pouvoir antipeptique	68
Pouvoir antitryptique	69
I. - Pathologie humaine,	
Pneumonie	70
Suppurations	70
Blessures	70
Cancer	71
II. - Pathologie expérimentale et causes de ces variations.	
a) Résorption trypsine pancréatique	79
b) Destruction leucocytaire	80
c) — cellulaire. - Rapports de l'antitrypsine avec l'autolyse	82

CHAPITRE III

Pouvoir antitryptique du sérum et choc anaphylactique	86
---	----

QUATRIÈME PARTIE

Action empêchant de la sérum sur les diastases microbiennes

CHAPITRE I

Les protéases bactériennes - Leur préparation.

Choix de la bactérie	92
Influence de l'âge	93
— du milieu	94
Emploi de la protéase précipitée	94
Emploi des filtrats	94

CHAPITRE II

Action du sérum normal et du sérum préparé. - Sérums anti- protéasiques. - Leur action contre les protéases antigènes correspondantes	96
---	----

CHAPITRE III

§ I. Spécificité des antiprotéases.	
a) en dehors de l'espèce	101
b) dans l'espèce antigène	101
§ II. Réaction de l'antiprotéase. Importance et valeur de cette réaction	
a) Identification de germes pyocyaniques. — B. Pyocyaniques. Pyocyanoides	103
b) Diagnose de variétés de B. Proteus	108

CHAPITRE IV

Propriétés des sérums antiprotéasiques. Antiprotéases et agglutinines	110
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.	113

INTRODUCTION

A côté de constantes physiques : densité, indice de réfraction, conductibilité électrique, point de congélation... et chimiques : concentration en eau, matières protéiques, minérales... il existe pour nous dans le sérum sanguin des *constantes physiologiques* d'un intérêt théorique et pratique non moins considérable : le pouvoir antidiastatique est au nombre de celles-ci.

Ignorée jusqu'à ces toutes dernières années, à peine effleurée dans les traités les plus récents de sérologie, cette question qui touche à l'important problème de l'immunité naturelle ou acquise, n'en a pas moins donné lieu à un nombre considérable de mémoires. Dénêler à travers l'amas de publications qui débordent des revues françaises et étrangères, ce qui a été dit d'essentiel sur ce sujet embrouillé et complexe était un travail devenu nécessaire. Cette confrontation des résultats accumulés par nos prédécesseurs, servira de point de départ, nous l'espérons, pour de nouvelles et fructueuses recherches dans une voie encore peu battue ; nous avons pu nous-mêmes y glaner quelques faits nouveaux.

Le présent ouvrage qui appartient également à la sérologie et à la chimie physiologique, comporte donc à côté d'une partie bibliographique importante, une partie de documentation personnelle, éparse dans les différents chapitres.

L'exposé de notre sujet se développe de la façon suivante, il se trouve détaillé dans notre table des matières. Nous avons étudié successivement l'action du sérum sur les diverses diastases coagulantes, hydrolysantes, oxydantes qui ont jusqu'ici retenu l'attention des chercheurs. Nous n'avons pas cru devoir séparer à propos de chaque diastase l'action antifermentaire d'immunisation de l'action antifermentaire normale, ni disjoindre de l'étude de chacune des actions antifermentaires envisagées la question de la spécificité qui est avant tout un fait d'expérimentation.

A la suite de l'énoncé et de la discussion des techniques employées

on trouvera une étude des propriétés physico-chimiques des antifermments, de leur nature, de leurs variations. Un développement tout particulier a été accordé à la question du pouvolr antitryptique dont les modifications au cours de divers états pathologiques ont suscité un nombre considérable de travaux et à celle des antiprotéases bactériennes, chapitres sur lesquels nos expériences ont plus particulièrement porté. Ce dernier sujet a été renvoyé en fin d'ouvrage, il a reçu dans un chapitre spécial tout le développement qu'il comporte.

Nous apportons ici des faits et pensons n'avoir laissé dans l'ombre aucune théorie importante. Nous avons la plupart du temps pris parti dans le débat et si parfois nous nous sommes abstenu de conclure, c'est que l'absence d'expériences personnelles sur certains points encore insuffisamment établis n'entraînait pas notre conviction.

Aux chercheurs qui reprendront la question, de combler ces lacunes et de résoudre les nombreux problèmes qui se posent encore.

PREMIÈRE PARTIE

Action antidiastasique du sérum

Historique - Mise en évidence du pouvoir empêchant - Techniques
Spécificité de l'antiferment d'immunisation

CHAPITRE I

Action empêchante du sérum sur les diastases coagulantes.

I. — ACTION ANTIPRÉSURANTE

Action du sérum normal sur les présures animales

C'est sur la présure, ferment coagulant du lait, (lab - ferment des Allemands — rennet des Anglais) que le pouvoir antidiastasique du sang a été mis pour la première fois en évidence.

En 1887, HAMMARSTEN ⁽¹⁰²⁾ (*) établit l'incoagulabilité par la présure du lait additionné de sérum de Cheval, dont l'action empêchante serait plus forte que celle du sérum de Lapin. RÖDEN ⁽²¹⁸⁾ vérifie la même année ces observations et étudie plus en détail cette propriété particulière du sérum. Ses expériences, qui sont en somme les premières en date, mériteraient d'être rapportées moins succinctement. Disons seulement que le lab employé était un extrait de fromage dilué au 1/5 et que le sérum de Cheval était porté à la même dilution. Après avoir constaté que l'addition de 0 cc. 5 de sérum au 1/5 empêche la coagulation du lait additionné d'une quantité de lab suffisante pour le faire coaguler dans les conditions normales en 12 minutes, l'auteur note l'effet seulement retardateur de doses moindres de

(*) Les chiffres indiqués entre parenthèses renvoient aux numéros du répertoire bibliographique, placé à la fin de cet ouvrage.

sérum, les variations marquées de l'action empêchante des différents sérums animaux (Porc, Bœuf, Lapin, par ordre d'activité décroissante) et en précise les principaux caractères (thermolabilité, non dialysabilité...). En 1897, CAMUS et GLEY (³⁹⁻⁴⁰) signalent de leur côté l'action antiprésurante du sérum de Chien. En 1898, MORGENROTH (¹⁸⁶) expérimente sur le sérum de CHÈVRE et BRIOT (³⁴⁻³⁵), l'année suivante, conclut à l'existence dans le sang de nombreux animaux d'une substance de nature diastasique agissant sur la présure comme les antitoxines sur les toxines.

FULD et SPIRO, en 1900 (⁷⁶), notent l'action antilabique du sérum de Cheval à la dose de 0 cc. 2 (lait conservé avec chloroforme).

Technique. — La technique de BRIOT est la suivante.

On part d'une présure liquide de HANSEN de force diastasique telle qu'elle coagule environ 10.000 fois son volume de lait en 20 minutes à 35-40°.

Dans une série de tubes à essais on répartit 10 cc. de lait, 1 cc. de sérum et des doses progressivement croissantes de présure; on note le temps de coagulation du lait contenu dans chaque tube.

Malgré des variations individuelles dans une même série animale, le phénomène demeure le même dans son ensemble : pour une quantité fixe de sérum la coagulation ne se produit que si la dose de présure dépasse nettement une certaine dose limite. Cette dose minima de présure au delà de laquelle on observe une modification brusque du phénomène attendu est totalement indépendante de la quantité de lait : elle varie proportionnellement à la quantité de sérum. Le sérum agirait donc, ainsi que l'établit BRIOT, comme s'il annihilait une quantité de présure proportionnelle à son volume ; la quantité de présure inhibée par un centimètre cube de sérum peut être prise d'après lui comme mesure de la force antiprésurante de ce sérum.

En étudiant l'action de l'actinodiasase sur le lait, MESNIL (¹⁷²) a mis en évidence et déterminé le pouvoir antiactinoprésurant des divers sérums (Tableau 1-p. 4).

MORGENROTH, pour éviter l'illusoire destruction partielle de la présure pendant son action sur le lait, au lieu d'opérer à la température de 40° opère à la glacière ; il détermine la plus faible quantité de présure nécessaire pour produire la coagulation quand, après douze heures d'action à basse température, on porte le lait à 35-40°.

Action du sérum normal sur les présures végétales

L'action des sérums sur les présures animales se retrouve sur les présures végétales. Elle fut étudiée par MORGENROTH ⁽¹⁸⁷⁾ (1900) avec la cynarase, ferment caséifiant extrait de l'artichaut (*Cynara cardunculus*) par ROSETTI. Son étude fut reprise en détails par JAVILLIER ⁽¹¹⁸⁾ qui, en 1903, a donné la technique suivante :

Technique. — Les tubes de lait sont stérilisés d'abord par chauffage à 100° à vapeur fluante, le chauffage est renouvelé trois fois à 24 h. d'intervalle. La présure est constituée par du suc de luzerne filtré à la bougie et conservé à l'obscurité en tubes scellés. On prend comme unité la quantité de suc qui provoque la coagulation de 10 cc. de lait en 15 minutes à 41° (1 cc. 5 dans les expériences relatées par l'auteur.)

Les tubes de lait (10 cc.) sont additionnés de quantités croissantes du sérum à étudier et les tubes témoins reçoivent les mêmes quantités d'eau physiologique. On ajoute partout 1 cc. 5 de suc de luzerne, on porte au bain-marie à 41° ; on note le temps de coagulation.

La quantité de sérum qui inhibe l'action de l'unité de présure est variable selon l'espèce animale considérée, comme le montre l'énumération ci-dessous, dans laquelle le chiffre 1 indique le pouvoir antiprésurant du sérum dont 1 cc. inhibe l'unité de présure.

Porc	4.	Bœuf	0,76
Cobaye	1.	Chèvre	0,45
Lapin jeune	1.	Cheval	0,25
Veau	0,90	Lapin adulte	0,25
Mouton	0,90		

En milieu antiseptique (mélange lait-sérum-présure saturé de chloroforme et recouvert d'une légère couche d'eucalyptol), les résultats sont du même sens, mais la digestion du caséum est, d'après ce même auteur, plus faible et plus lente.

Dans le tableau suivant, nous rapprochons les résultats de MM. JAVILLIER, BRIOT et MESNIL. Les différences sensibles de l'action d'un même sérum sur des présures d'origine différente constituent un

argument important en faveur de la non-identité de ces présures. Nous reviendrons d'ailleurs dans la suite sur ce point.

Présure de Luzerne (Javillier)	Présure Hansen (Briot)	Actino-présure (Mesnil)
Porc	Porc	Cheval
Cobaye	Cheval	Chèvre
Lapin jeune	Veau	Mouton
Veau	Lapin jeune (14 jours)	Lapin
Mouton	Poule	Oie
Bœuf	Mouton	Poule
Chèvre	Bœuf	
Cheval	Lapin adulte	
Lapin adulte	Chèvre	

Tableau 1

Il est aussi à signaler des différences individuelles importantes en rapport avec l'âge : le sérum d'individu jeune est plus antiprésurant que le sérum de l'adulte, fait qui n'est pas sans intérêt et que nous retrouverons pour d'autres actions antidiastases.

Surproduction d'antiprésure. — Immunisation

L'existence d'une action antiprésurante étant ainsi parfaitement établie, on fut amené à en élever le taux dans le sérum par injections de présure. C'est ce que cherchèrent à réaliser MORGENROTH et BRIOT, avec la présure animale et JAVILLIER avec les présures végétales. Les Chèvres de MORGENROTH étaient injectées par voie sous-cutanée avec une solution de lab stérilisée par l'iode. Alors que le sérum de Chèvre normale n'a pas d'action antiprésurante marquée, le sérum de Chèvre préparée en présente une très nette avec des variations individuelles parfois très accusées. L'auteur suivait jour par jour la marche de l'immunisation par l'examen du lait de ses Chèvres, l'antidiastase passant dans la sécrétion lactée et un parallélisme assez étroit existant d'après MORGENROTH entre la teneur en antiprésure

du sérum et celle du lait. Il déterminait la plus faible quantité de présure nécessaire pour produire la coagulation de 10 cc. de lait de la Chèvre en cours d'immunisation. Alors que le lait de la Chèvre normale, comme celui de la Vache, coagule pour une quantité de lab de 1/3.000.000, le lait d'une Chèvre immunisée ne coagule qu'à 1 1/30.000 (1).

L'animal d'expérience de BRIOT fut d'abord (35) (1900) le Lapin, qu'il injecta avec de la présure HANSEN liquide, dialysée pour la débarrasser de la grande quantité de Na Cl qu'elle renferme jusqu'à l'obtention d'une solution isotonique au sérum sanguin. Les injections d'une solution stérilisée furent pratiquées sous la peau, dans les veines ou bien dans la cavité péritonéale tous les 8-10 jours. Comme ceux de MORGENROTH, les résultats de BRIOT démontrent une forte augmentation d'antiprésure : alors qu'au début 1 cc. de sérum est capable de neutraliser 1 cc. de présure à 1/1.200, après 8 injections la même quantité de sérum neutralise la même quantité de présure diluée au 1/50 seulement. BRIOT reprit en 1914 (37) l'étude comparative des divers modes d'immunisation chez le Lapin et le Cobaye. De ses nombreuses expériences il résulte que le mode d'immunisation le plus favorable paraît être jusqu'ici l'immunisation par petites doses journalières, *par voie intrapéritonéale*.

Il est à noter que le pouvoir antiprésurant a déjà subi un affaiblissement très appréciable, si la saignée est pratiquée 8 jours après la dernière inoculation, surtout dans le cas d'injections journalières; ce détail serait à revoir. La possibilité d'augmenter le pouvoir antiprésurant par immunisation a été confirmée en ce qui concerne les *présures végétales* par MORGENROTH (187) avec la cynarase, et surtout JAVILLIER (118) dont les essais effectués avec les présures d'ivraie et de luzerne concordent pleinement avec les résultats de BRIOT pour la présure animale.

Spécificité de l'antiprésure. — L'augmentation du pouvoir antiprésurant se fait dans un sens étroitement spécifique. MORGENROTH

(1) Pour nous conformer au langage courant et ne pas surcharger notre texte, nous parlerons d'antiprésure, d'antitrypsine, d'antiprotéases, au lieu de *pouvoir antiprésurant*, *pouvoir antitryptique*, etc.... Il est bien entendu que ceci est purement conventionnel et n'implique pas l'existence dans le sérum de substances isolées, définies qui constitueraient réellement des entités chimiques. Si telle est la vérité, elle est loin d'être démontrée.

(¹⁸⁷) (1900) dont les expériences sont les premières en date, a noté chez ses Chèvres que l'immunisation avec la cynarase en provoquant un accroissement notable du pouvoir anticynarase du sérum, ne modifiait aucunement le pouvoir antilab de ce même sérum ; inversement le pouvoir du sérum de Chèvre immunisée contre le lab paralysait l'action d'une dose de lab 20 fois plus forte que la dose coagulante et seulement celle d'une quantité 3 fois plus forte de cynarase. Les résultats de JAVILLIER (1903) avec les présures d'ivraie et de luzerne et la présure de HANSEN, ne sont pas moins nets : l'antisérum de Lapin, énergique vis-à-vis de la présure animale, ne constitue pas un antisérum vis-à-vis de la présure de luzerne ou d'ivraie et réciproquement. Ainsi s'affirme au moyen de ces réactions sériques l'individualité des présures animales et végétales, fait d'une extrême importance sur lequel nous aurons à revenir.

L'immunisation vis-à-vis d'une présure végétale donnée, détermine-t-elle par ailleurs une augmentation du pouvoir empêchant du sérum vis-à-vis des autres présures végétales ? En d'autres termes, dans quelles limites exactes cette spécificité s'exerce-t-elle ? Le petit nombre d'expériences de JAVILLIER ne saurait, d'après l'auteur lui-même, entraîner de conclusion absolue. Il ressort néanmoins que l'immunisation paraît nettement accusée vis-à-vis de la présure qui a servi à la préparation de l'animal. Ces résultats donneraient crédit aux observations de MORO (¹⁸⁹) (1904) ; ce dernier serait parvenu à différencier avec du sérum de Lapin préparé par du lab bovin, le lab d'origine humaine du lab d'origine animale.

II. — ACTION DU SÉRUM CONTRE LE FIBRIN-FERMENT

A la suite de notre étude sur l'antiprésure, nous devons une mention particulière pour les recherches de BORDET et GENGOU (²⁶) (1901) sur les sérums anticoagulants. Si les sérums neufs de Cobaye, Lapin, Chien, Mouton ne paraissent pas posséder de substances antagonistes des fibrin-ferments des diverses espèces animales, l'action neutralisante des sérums d'animaux préparés est par contre des plus nettes. C'est ainsi que le sérum de Cobayes injectés de sérum ou de plasma frais de Lapin (3 injections de 5cc. à 8 jours d'intervalle, saignée 12 jours après la dernière injection) empêche la coagulation du sérum de Lapin. Ce pouvoir empêchant exercé sur le fibrin-ferment de ce dernier animal est nettement spécifique sans l'être néanmoins d'une manière absolue.

Le sérum de Cobaye ainsi traité montre en effet un léger affaiblissement de l'activité coagulante de ce même sérum : son action neutralisante sur le sérum de Chien est moindre encore : elle est nulle sur celui du Mouton. Les fibrin-ferments provenant d'espèces animales différentes, malgré une grande similitude de caractères, ne seraient donc pas complètement identiques : c'est du moins ce qui ressort des précédentes constatations.

CHAPITRE II

Action empêchante du sérum sur les diastases hydrolysantes

A. — Action du sérum sanguin sur les diastases hydrolysantes des matières protéiques

I. — ACTION ANTIPEPTIQUE

Le pouvoir antipeptique du sérum a été signalé pour la première fois par SCHNAPPAUF ⁽²³⁸⁾ (1888), qui constata que le foie et les muscles possédaient aussi la même action empêchante vis-à-vis du ferment. La question fut reprise par MATTHES ⁽¹⁷⁰⁾ en 1894 et simultanément en 1897 en France, en Italie et en Allemagne par CAMUS et GLEY ⁽⁴⁰⁾, PUGLIESE et COGGI ⁽²⁰³⁾, HAHN ⁽⁹⁹⁾, qui l'étudièrent chez le Chien, le Lapin, le Cheval, la Chèvre. BRIOT ⁽³⁶⁾ en 1902, GLAESSNER ⁽⁹¹⁾ en 1903, ZUNZ ⁽²⁹¹⁾ en 1905 et JACOBY ⁽¹¹⁷⁾ l'année suivante poursuivirent les recherches sur les mêmes animaux. CANTACUZENE et IONESCO MIHAILESTI ⁽⁴³⁾ (1908), à l'encontre de SACHS ⁽²³⁴⁾ (1902), mirent en évidence la présence d'anticorps spécifiques chez le Lapin. LOEPER et ESMONET ⁽¹⁶²⁾, JOCHMANN et KANTOROWICZ ⁽¹³³⁾, la même année, MORGENROTH ⁽¹⁸⁷⁾, EISNER ⁽⁶⁴⁾, OGURO ⁽¹⁹⁶⁾ (1909) consacrèrent quelques pages au chapitre de l'antipepsine. Enfin SLOVTZOFF ⁽²⁴⁸⁾, HAMBURGER ⁽¹⁰¹⁾, P. L. MARIE ⁽¹⁶⁹⁾ et RUBINSTEIN ^(225 à 229) (1911), LINossier ⁽¹⁶¹⁾ (1913), apportèrent aussi dans cette étude leur contribution personnelle.

Mise en évidence du pouvoir empêchant. - Techniques

Les procédés employés à la recherche et à la détermination du pouvoir antipeptique sont à quelques exceptions et quelques variantes près, les mêmes que ceux utilisés pour la mesure du pouvoir antitryptique. Les tests sont identiques, la réaction du milieu seule varie. Nous ne ferons donc que les passer rapidement en revue, nous proposant d'entrer dans les détails à propos de l'antitrypsine qui présente pour nous plus d'intérêt. Rappelons en passant que toutes les méthodes de mesure de l'antitrypsine (méthode de LAUNOY ⁽¹³⁴⁾ entre autres) ne sont pas inversement forcément applicables à la détermination du pouvoir antipeptique. On sait, en effet que l'action peptique pousse moins loin la protéolyse qui s'arrête au terme peptones alors que l'action de la trypsine conduit jusqu'aux acides aminés. Aussi croyons-nous ne pas devoir nous dispenser d'une énumération qui ne manquera pas de mettre plus de clarté en notre sujet.

Les techniques employées peuvent être rapportées à trois tests principaux : ovalbumine ou sérum albumine, fibrine et gélatine.

1^o Méthode de Mett. — La classique méthode de METT, dont il sera reparlé plus loin, a été employée par ZUNZ, SLOVTZOFF, JOCHMANN et KANTOROWICZ, CATACUZENE et IONESCO MIHAESTI. Des plus approximatives, elle demande à être employée dans des conditions toujours identiques.

ZUNZ ⁽²⁹¹⁾ dans son mémoire de 1905 fait usage d'une solution chlorhydropepsique renfermant 0,10 à 0,20 % de pepsine pure de GRÜBLER et 0 g. 3 % d'acide chlorhydrique. Dans une série de tubes, il mesure 2 cc. de solution chlorhydropepsique avec 0 cc. 5 de solution chlorurée sodique à 8 0/00 et 0 cc. 5 de sérum (ou de leur mélange). Les tubes de Mett sont introduits dans les divers essais et les longueurs d'albumine digérée sont mesurées après 24 heures d'étuve à 38°.

L'addition de toluol n'est pas indiquée dans le cas présent, l'acidité des mélanges étant d'après ZUNZ, suffisante pour empêcher le développement des microorganismes pendant le cours de l'expérience et surtout l'addition d'antiseptiques entravant davantage que dans le cas du suc pancréatique l'action protéolytique de la pepsine.

Cette dernière, ainsi que l'avait constaté O. SCHWARZ (²¹³) dissolvant mieux le sérum coagulé que le blanc d'œuf, le même auteur propose l'emploi de sérum sanguin de Cheval d'une constitution plus homogène. P. L. MARIE substitue aussi aux tubes d'ovalbumine le sérum humain recueilli aseptiquement et coagulé à 95° pendant 5 minutes. Il emploie par ailleurs une solution de pepsine à 2 % dans l'acide chlorhydrique à 0,5 %.

2° Procédé au carmin-fibrine de Grützner (1874). — Il est basé sur le principe suivant, à savoir : le retard apporté par l'addition de sérum dans l'apparition de la coloration rouge due à la mise en liberté du carmin au cours de la digestion peptique du carmin-fibrine. Cette apparition, qui dans le seul mélange pepsine-fibrine HCl, se produit au bout de 10 à 15 minutes n'a lieu que beaucoup plus tard en présence de sérum, ou ne se traduit pas dans le cas d'une inhibition complète de la part de ce dernier.

RUBINSTEIN (²²⁸), sur les indications d'OGURO (¹⁹⁶) en a donné une technique assez précise :

Il est fait usage de sérum dilué au 1/10^e et d'une solution de pepsine au millième dont on en répartit 0 cc. 4 dans une série de tubes. On ajoute des doses croissantes (0 cc. 1 à 1 cc.) de sérum dilué, et on porte les essais 30 minutes à l'étuve à 37°.

On ajoute 0 cc. 5 d'HCl N/10 et quantité suffisante d'eau physiologique jusqu'à obtention d'un même volume dans tous les tubes. On introduit un flocon de carmin-fibrine de la grosseur d'un petit pois et on maintient les mélanges 4 heures à l'étuve.

Il est indispensable de constituer un témoin : carmin-fibrine + HCl, + eau physiologique. Avec les meilleurs échantillons et malgré un lavage préalable d'une demi-heure à l'eau courante, il n'est pas de carmin-fibrine qui, à l'encontre des assertions de GRÜTZNER et ZAWJOLOW, ne cède pas un peu de sa matière colorante en présence d'HCl. Ce fait, et ce n'est pas là un des moindres inconvénients de cette méthode, rend la lecture des résultats assez difficile. Le tube présentant la même teinte que le tube témoin marque le point d'arrêt de la digestion peptique et donne la mesure du pouvoir antipeptique du sérum. Par ce procédé l'indice antipeptique du sérum normal humain est de 6 à 7, c'est-à-dire 0 cc. 6-0 cc. 7 de sérum dilué à 1/10 neutralise l'action de 0 cc. 4 de solution de pepsine à 1 0/00).

3^o Procédé à la gélatine. — C'est le procédé de choix. Entrevue par JACOBY, SACHS, OGURO, cette méthode employée plus systématiquement et mise au point par RUBINSTEIN (^{227, 228}) est basée sur la propriété que possède la pepsine de liquéfier la gélatine en milieu acide.

Le test est constitué par une solution de gélatine très pure, neutre et privée de sels, à 2,5 % dans l'eau distillée ; cette solution après ébullition de 5 minutes ou bien après l'addition de 0 g. 50 de fluorure de sodium pour 100 cc., est filtrée. On emploie une solution de pepsine à 2 % dans l'eau distillée, pepsine dont on doit s'assurer du titre et qui, à la dose de 0 cc. 3 à 2 0/00, doit liquéfier en présence d'HCl, 1 cc. de gélatine à 2,5 %. Le sérum à examiner est enfin dilué au 1/10^o.

Dans une série de tubes à hémolyse on introduit 0 cc. 4 de solution peptique et des doses croissantes de sérum (0 cc. 1... 1 cc.) ; le volume est complété à 1 cc. 5 dans chaque tube par addition d'eau physiologique et les essais portés à 37^o pendant 1/2 heure. On ajoute seulement ensuite 0 cc. 1 d'HCl normal et 1 cc. de gélatine ; on replace les mélanges à l'étuve ; on les retire 4 heures après ; puis on les laisse à la glacière jusqu'au lendemain. Le premier tube dans lequel la gélatine s'est complètement solidifiée donne l'indice antipeptique du sérum. Deux tubes témoins contrôlent, l'un l'activité liquéfiante de la dose de pepsine employée, l'autre la non-influence de l'acide seul sur la gélatine.

Ce procédé donne 4 à 5 comme valeur du pouvoir antipeptique normal : (0 cc. 4-0 cc. 5 sérum neutralise l'action de 0 cc. 4 de pepsine diluée à 2 0/00. Le titrage de l'activité du ferment employé que l'on voit ici figurer, devra faire préférer l'emploi de cette dernière méthode dont les résultats sont des plus comparables.

Antipepsine normale et antipepsine d'immunisation. — Vérifiée par RUBINSTEIN chez l'Homme, le Chien, le Cheval, le Bœuf, le Lapin, le Cobaye, l'Oie, la Poule, l'action antipeptique du sérum est à l'heure actuelle, malgré les contestations de SLOVTZOFF (1910) nettement établie.

On arrive difficilement à augmenter par l'immunisation ce pouvoir antipeptique. SACHS (1902) RUBINSTEIN ont réussi cependant à en provoquer une augmentation très nette chez l'Oie et la Poule ; mais la préparation des animaux est longue (2 mois 1/2 pour SACHS ;

3 mois pour RUBINSTEIN) et la quantité de ferment injectée doit être assez élevée (12 gr. et 15 gr.). De même CANTACUZENE et IONESCO MIHAILESTI (⁴¹) sont arrivés à immuniser des Lapins et ont pu déceler par la réaction des précipitines et la réaction de fixation, la présence d'anticorps dans le sérum des animaux injectés.

II. — ACTION ANTIPAPAÏNIQUE

Il convient tout naturellement de mentionner à la suite de l'action antipeptique du sérum, l'action retardataire que ce dernier exerce sur le processus protéolytique déterminé par le ferment végétal qu'est la papaïne, ou papayotine, extrait du latex du *Carica papaya*.

En opposition avec les résultats négatifs d'ACHALME (²) (1901), LINOSSIER (¹⁶¹) (1918) a constaté, en employant des tubes de Mett remplis de gélatine un ralentissement très net de la digestion papaïnique en présence du sérum de Cheval (1 à 2 cc. de sérum dilué au 1/4); DELEZENNE et POZERSKI (⁵⁵) (1903) auraient observé jusqu'à un arrêt complet de cette digestion.

III. — ACTION ANTITRYPTIQUE

De toutes les propriétés antiprotéolytiques, la mieux étudiée est sans contredit celle que le sérum sanguin exerce vis-à-vis de la trypsine, ferment soluble qui en milieu neutre ou alcalin, transforme les substances protéiques d'abord en albumoses et peptones puis aboutit à la formation d'acides aminés et d'un résidu inattaquable d'antipeptones. Le nombre de travaux que cette question a suscités est considérable. On verra au cours de cette étude combien sont nombreux en effet, depuis 1888, date à laquelle SCHNAPPAUT et NASSE (²³⁹) démontrèrent l'inhibition de la trypsine par le sérum, les expérimentateurs qui ont attaché leurs noms à cette étude. Faut-il en chercher uniquement la raison dans l'intérêt que présente par elle-même la trypsine en tant que diastase protéolytique (digestive), en tant qu'agent actif du suc pancréatique, et dans ce fait que cette propriété empêchante se retrouve normalement dans tous les sérums ? Ne doit-on pas plutôt la rapporter à l'existence de ferments analogues

à la trypsine dans la plupart des organes (foie, rate, placenta...) dans les leucocytes, à la vaste répartition des protéases endocellulaires dont l'importance physiologique et pathologique n'échappe à personne ? La mise en évidence par JACOBY en 1900 de ces diastases qui, dans chaque cellule président aux transformations de la matière protéique, de par le rôle considérable qu'elles jouent chez l'être vivant, devaient du fait de l'analogie de leur action avec la trypsine, singulièrement élargir la question.

La plupart des méthodes qui servent à la mesure de l'activité tryptique ont été appliquées à la détermination du pouvoir empêchant du sérum vis-à-vis de ce ferment. Ces méthodes qui emploient les substances protéiques les plus diverses (fibrine, ovalbumine, sérum-albumine, caséine, lait, gélatine) sont loin cependant d'être toutes adéquates : les unes parce que trop compliquées, les autres parce que ne donnant que des chiffres trop approximatifs ou même ne fournissant le plus souvent que des résultats d'ordre purement qualitatif. Nous les passerons successivement en revue en essayant de mettre un peu d'ordre dans ce chaos de techniques que l'on peut rapporter à trois groupes principaux. Nous étudierons d'abord et ferons la critique d'un premier groupe de procédés reposant sur la simple et grossière constatation d'un fait : l'arrêt de la digestion dans des conditions souvent plus ou moins arbitrairement déterminées, ces méthodes d'ordre purement qualitatif.

A la suite des méthodes physiques dont une retiendra plus particulièrement notre attention, nous exposerons dans un dernier paragraphe les méthodes chimiques basées sur une mesure plus exacte de la marche de l'hydrolyse, en nous étendant plus longuement sur la méthode proposée par LAUNOY (¹⁵³⁻¹⁵⁴), méthode qu'il nous a été donné d'appliquer dans l'étude de nombreux sérums et qui semble en tous points des plus satisfaisantes.

§ I

1^o Méthode de Mett à l'ovalbumine. — C'est celle à laquelle les expérimentateurs semblent du fait de sa commodité avoir eu le plus souvent recours dans la pratique et qu'il convient de citer en premier lieu. La mesure du pouvoir empêchant est fournie par la

quantité de sérum capable d'arrêter la digestion indiquée dans le cas présent par la longueur évaluée en millimètres d'albumine digérée.

Voici la technique qui a été proposée par ZUNZ (²⁹¹) en 1905 :

Pour préparer les tubes d'albumine, on aspire le blanc d'œuf dans des tubes en verre de 3 à 3 $\frac{m}{m}$ 5 de diamètre qu'on scelle à la lampe et porte dans l'eau amenée ensuite à l'ébullition. La coagulation de l'ovalbumine étant ainsi simultanément obtenue dans tous les tubes, on les découpe en fragments de 2 cm. environ de longueur, on les introduit verticalement dans le liquide en expérience placé dans des tubes à essai et de telle façon que les deux tiers inférieurs du tube d'albumine plongent dans la solution, tandis que le tiers supérieur se trouve dans la couche de toluol surnageante.

On a réparti dans les tubes 2 cc.5 de solution diastasique, 0 cc.5 de sérum et de solution de chlorure de sodium à 0,85 % ou de leur mélange.

Après 24 heures d'étuve à 38° on mesure au microscope et à un faible grossissement à l'aide d'une règle divisée en millimètres ou fractions de millimètre, les longueurs d'albumine digérée aux extrémités inférieures seules attaquées.

ZUNZ fait usage de suc pancréatique activé (mélange à parties égales de suc inactif et de solution d'entérokinase) laissé deux heures à l'étuve à 38° avant l'expérience. La solution diastasique et le sérum sont laissés en contact une demi-heure à 38° avant l'introduction des tubes de METT.

Cette méthode employée par ZUNZ pour l'étude du sérum de Chien a été utilisée par GLAESSNER (⁹¹) (1903), SCHWARZ (²⁴⁴⁻²⁴⁵) (1909), YAMANOUCHI (1910). Elle n'est pas à l'abri de nombreuses critiques. Assez approximative, la mesure des longueurs d'albumine digérée n'étant pas un procédé des plus rigoureux en soi, elle demande à être employée dans des conditions toujours identiques. De plus, elle semble confondre les processus fort différents de la dissolution, de la diffusion et de l'hydrolyse. Ainsi que le souligne DUCLAUX la solution diastasique n'atteint l'albumine à digérer que par diffusion et les surfaces de contact ne se renouvellent pas assez rapidement.

2° Méthode de Müller et Jochmann aux plaques de Loeffler. — Employée tout d'abord par MÜLLER et JOCHMANN (¹⁹¹) (1906) pour l'étude des propriétés antiprotéolytiques du pus, cette méthode a

été appliquée par MARCUS (¹⁶⁷) en 1908 à l'étude du sérum. Indiquée par ZUNZ (²⁹²) dans son mémoire de 1909 la technique en a été bien établie par BRIEGER et TREBING (³²) (1908) POGGENPOHL (²⁰³). En voici l'exposé : Le milieu de LOEFFLER, constitué par un mélange de trois parties de sérum de bœuf stérilisé et d'une partie de bouillon glucosé à 1 %, est réparti dans des boîtes de PETRI et solidifié à 90-92°. On emploie une solution extemporanée de trypsine à 1 % dans l'eau physiologique.

Au moyen de petits godets en porcelaine on prépare une série de dilutions effectuées en ajoutant à une goutte de sérum un nombre croissant de gouttes de solution tryptique. On prélève une goutte de chaque mélange que l'on dépose sur la plaque de sérum coagulé d'une boîte de PETRI. Les boîtes de PETRI qui ont reçu ainsi avec un certain nombre de gouttes des divers mélanges trypsine-sérum, une goutte de solution tryptique seule comme témoin, sont portées à l'étuve à 50-55° pendant 24 heures. Après ce laps de temps qui d'après ISAYA (1911) pourrait être ramené à 6 ou 8 heures, on examine par transparence en quels points il y a eu arrêt de la digestion ; celui-ci se traduit par une fluidification des protéines coagulées et l'apparition d'un godet de dimensions plus ou moins considérables, absolument typique et taillé comme à l'emporte-pièce. De simples petites taches blanc-grisâtre produites par la goutte de mélange desséché marquent les points où il y a eu inhibition de la trypsine par le sérum.

L'indice est donné par le rapport qui existe entre la quantité de sérum et celle de trypsine neutralisée, en d'autres termes par le nombre de gouttes de solution de trypsine dont l'action est paralysée par une goutte de sérum. C'est la notation employée par MARCUS, POGGENPOHL, FINZI (⁷⁸), BRIEGER et TREBING qui opèrent ainsi que nous l'avons exposé avec *une quantité croissante de trypsine et une quantité fixe et arbitraire de sérum*.

ZUNZ dilue plus ou moins sa solution diastasique par addition de sérum, de solution de chlorure de sodium à 0,85 %, ou d'un mélange des deux. Le mesure du pouvoir empêchant est fournie dans ce cas par la *quantité de sérum nécessaire pour annihiler le pouvoir digestif d'une quantité fixe de solution diastasique*.

Procédé de Mintz (1910). A la suite du procédé de MÜLLER et JOCHMANN dont il est une variante plus originale que précise, signa-

lons très rapidement le procédé de MINTZ (182-183) lequel éprouve le pouvoir antitryptique de sérum non pas sur l'albumine coagulée de sérums étrangers, mais sur l'albumine sanguine même du sujet chez lequel on expérimente.

Sa technique peut se résumer ainsi : à partir d'une solution de trypsine glycinée à 2 % on établit une série de solutions plus faibles 1,8 %, 1,6 % jusqu'à 1 %. Par aspiration, on introduit dans une pipette munie d'une poire en caoutchouc la trypsine glycinée de dilution variable et le sérum à examiner ; ce dernier est en même quantité dans toutes les expériences. Après avoir effectué le mélange par aspirations et refoulements successifs on ferme à la lampe l'extrémité inférieure du tube et on le place 24 heures à l'étuve à 37°. La partie capillaire de la pipette, est ensuite coupée puis scellée et le tube plongé dans l'eau bouillante. S'il y a eu digestion du sérum, on obtient en projetant le contenu du tube sur du papier filtre une tache de liquide. Dans le cas contraire, on retire un cylindre de sérum coagulé et le titre de la solution fermentaire qui arrête la digestion du sérum indique le pouvoir antitryptique de ce dernier. Cette méthode est peu recommandable ; on sait que la trypsine, même très active, ne digère que difficilement et lentement les albumines non coagulées.

L'imprécision de ces méthodes est manifeste et les résultats auxquels elles conduisent sont loin d'être comparables d'une expérience à l'autre. Aussi les auteurs recommandent-ils eux-mêmes, quand il s'agit de déterminer l'indice antitryptique d'un sérum de faire toujours plusieurs expériences de contrôle avec des sérums normaux. C'est ainsi que WIENS ⁽⁸⁸¹⁾ (1909) préconise comme terme de comparaison la leucofermentine de MERK qui n'est rien moins que du sérum de cheval dont le pouvoir antitryptique a été porté par injections de pancréatine à la même valeur que celui du sérum humain.

De plus, sans insister sur l'ignorance totale des lois d'action des diastases, qui semble avoir présidé à l'élaboration de ces méthodes et de celles qui suivent, et tout en ne leur reconnaissant qu'une valeur purement qualitative, nous nous bornerons seulement ici à souligner quelques critiques de détail. Par exemple, pour la méthode de MÜLLER, l'inconstante composition chimique du sérum de Loeffler, dont la teneur en graisses, en albumines est loin d'être toujours identique, les variations inévitables de la profondeur et de la teneur en eau de la couche de sérum coagulé, etc. Nous rappelons aussi que

la température de 55° doit affaiblir dans des proportions bien différentes l'action fermentaire de la trypsine et l'action antidiastase du sérum.

3° Méthode à la caséine (Fuld-Gross, 1908). — Proposée en même temps par ces deux auteurs, ce procédé fait usage de la caséine, qu'HEDIN (¹⁰⁵) trois ans auparavant avait signalée à l'attention des expérimentateurs. La technique dernièrement indiquée par RUBINS-TEIN (^{229bis}) est à peu de chose près celle dont ZUNZ fait mention en 1909. Elle a été appliquée avec quelques variantes par de très nombreux auteurs. BERGMANN et BAMBERG (¹⁹), THALER, (^{255 - 256}), FURST (⁷⁷), EISNER (⁶⁴), CORSINI (⁵³), RONDONI (^{219 à 221}), KAMMERER (¹³⁵), R. WEIL (²⁶⁷), WEIL et BRAUN (²⁶⁹), WEINBERG et ses collaborateurs (^{270 à 277}), YOUNG (²⁸⁹), TEALE et BACH (²⁵²).

Technique. — Le degré de la digestion est apprécié macroscopiquement par l'acidification du mélange : dans le cas de digestion totale le liquide reste clair après addition d'acide acétique ; dans le cas contraire il se produit un trouble ou une opalescence plus ou moins prononcée et dont l'intensité dépend de la proportion de caséine non digérée.

La solution de caséine est préparée en dissolvant 1 gr. de caséine dans 100 cc. de NaOH N/10. On agite fortement en ajoutant la soude par fractions et en chauffant légèrement au besoin (30 à 45 degrés pendant 1/2 heure). On neutralise ensuite au tournesol avec HCL N/10 et on complète avec de l'eau physiologique à 500 cc. Il est bon d'employer la solution dans les 24 heures ou de la conserver tout au plus 2 ou 3 jours à la glacière.

COBLINER (⁵²) la stérilise à l'autoclave à 115° et prétend obtenir d'aussi bons résultats.

On emploie une solution de trypsine faite dans les conditions suivantes :

Trypsine	0 g. 50
Eau phys. stérile.....	50 cc.
Co ³ Na ² en solution N (à 53 g. [°] / ₁₀₀)	1 cc.

et maintenue à la glacière jusqu'au lendemain. On la dilue avant usage au 1/5, 1/10 ; 1/15 avec de l'eau physiologique.

Le sérum frais non chauffé est employé en dilution à 2 %, dans l'eau physiologique.

On prépare ensuite de l'acide acétique alcoolique :

Acide acétique.....	5 cc.
Alcool absolu	45 cc.
Eau distillée.....	50 cc.

Le titrage de la trypsine constitue une opération préliminaire que nous voyons figurer ici pour la première fois. A partir de la solution faite la veille dans les conditions relatées, on prépare trois dilutions : 1/5 ; 1/10 ; 1/15. On met en présence de 2 cc. de solution de caséine des doses croissantes (0 cc.-1 à 0 cc.-8) de chaque dilution complétées à 1 cc. avec de l'eau physiologique. On porte 45 minutes à l'étuve à 37° et après avoir laissé les tubes 15 minutes à la température du laboratoire on ajoute à chacun 3 gouttes d'acide acétique alcoolique. *La dilution de trypsine à employer est celle qui à la dose de 0 cc. 5 digère complètement la caséine* (généralement dilution au 1/10), la digestion totale étant indiquée par le premier tube restant clair.

Dans une série de tubes on répartit ensuite des doses croissantes de trypsine en commençant par celle qui a complètement digéré la caséine. *On ajoute 0 cc. 5 de sérum à 2 %* et après agitation 2 cc. de solution de caséine. La neutralisation de la trypsine par le sérum est presque instantanée. KURT MEYER (¹⁷⁷) en opposition avec HEDIN (¹⁰⁵) est arrivé aux mêmes résultats soit en ajoutant la caséine aussitôt, soit après une heure de contact. Il juge le prolongement de ce contact inutile ; KAMMERER (¹³⁵) tient à le prolonger 2 heures, quant à EISNER (⁶¹), 10 minutes lui semblent suffisantes ; c'est à cette dernière opinion qu'il faut se rallier ainsi que nous avons pu le vérifier par nous-même.

Les mélanges sérum-trypsine-caséine sont placés 45 minutes à l'étuve à 37° ; R. WEIL (²⁶⁷) les maintient 2 heures sans meilleurs résultats.

On ajoute enfin la solution acétique et on fait la lecture soit 10 minutes après précipitation par l'acide comme l'indique RUBINSTEIN (^{229 bis}), soit au bout de 2 heures comme le font SCHORLEMMER et SELTER. (²⁴⁰).

L'indice antitryptique est donné dans cette méthode par la différence

entre la quantité de trypsine qui digère 2 cc. de caséine en présence du sérum et la quantité de cette même trypsine capable de digérer la même quantité de test sans sérum.

Dans le cas d'un sérum humain normal 0 cc. 9 à 1 cc. de trypsine titrée digérant 2 cc. de caséine, le pouvoir anti est égal à 0 cc. 4 ou plus simplement 4.

L. JACOB ⁽¹¹⁶⁾ (1909), afin que l'indice antitryptique soit toujours rapporté au pouvoir digestif de la trypsine, préconise l'emploi de la formule suivante :

$$i = \frac{(a' - a)}{a} 100$$

i = indice antitryptique.

a' = quantité de trypsine neutralisant une quantité donnée de sérum.

a = titre de la solution tryptique.

YOUNG opère en présence d'un excès de caséine qu'il précipite ensuite après digestion (4 heures à 37° en présence de toluène) par l'acide tannique et il dose dans le filtrat l'azote non coagulable par la méthode de Kjeldahl.

Dans la méthode indiquée par TEALE et BACH, la précipitation est effectuée après addition de fer colloïdal par une solution de sulfate de soude et sur une partie du filtrat concentré et décarbonisé, l'azote est dosée par nesslerisation. En raison même de sa longueur, cette technique, d'après les auteurs eux-mêmes, est difficilement utilisable.

4° Méthode au lait (Achalme et Stevenin, 1901). — Réservant à plus tard la discussion de la méthode de GROSS-FULD que nous engloberons dans une critique d'ensemble des méthodes énoncées, nous passerons directement au procédé d'ACHALME et STEVENIN ⁽³⁾. Ces auteurs utilisent le lait, un étroit parallélisme existant d'après eux, entre les actions présurante et hydrolytique de la trypsine. C'est du moins ce qu'a confirmé l'ensemble de leurs recherches sur les diastases du pus et c'est aussi l'opinion de DUCLAUX. Les changements d'aspect du lait sous l'influence de la digestion tryptique, marqués d'abord par une précipitation de la caséine, puis la redissolution du précipité et la clarification du mélange, peuvent ainsi rendre compte, dans une certaine mesure, de la marche de la digestion.

Technique. — On répartit dans des tubes 3 cc. de lait écrémé stérilisé 30 minutes à 120°. On ajoute 1 goutte de sérum et un nombre progressif de gouttes de solution tryptique. On porte à l'étuve à 45° et au bout de 24 heures on note les modifications qui se sont produites.

Le numéro du premier tube resté intact donne le nombre de gouttes de solution diastasique neutralisée par 1 goutte de sérum.

Il est fait usage d'une solution de trypsine telle qu'à la dose de 5 gouttes elle digère en 1 heure à 45°, 3 cc. de lait.

Les auteurs ont apporté par la suite des modifications telles à leur procédé primitif, que le protocole en est interverti. C'est ainsi qu'ils mettent *en présence du lait, des quantités croissantes de sérum dilué à 1 % dans l'eau salée à 10 ‰ (de 1 cc. à 0 cc. 1) avec un volume égal de solution de trypsine titrée avec le sérum d'homme ou de cobaye.*

MANDELBAUM ⁽¹⁶⁸⁾ (1905) s'inspirant du même principe en a proposé deux variantes que nous exposerons très rapidement.

La première ne présente guère qu'un intérêt historique. Elle repose sur l'obtention dans le cas de digestion complète, de deux couches claires et transparentes, par addition d'éther (1 cc.) au mélange : lait 1 cc. sérum 0 cc. 1 et trypsine à doses croissantes, porté 30 minutes à 56°. On commence par la dose de trypsine capable de digérer 1 cc. de lait dans les mêmes conditions d'expérience et le premier tube qui montre un louche (couche inférieure sale), indique l'index antitryptique.

Plus pratique semble l'autre méthode de MANDELBAUM aux plaques de gélose-lait, méthode à laquelle J. C. ROUX et R. SAVIGNAC ⁽²²⁴⁾ ont eu recours ainsi que FRESEMANN VIETOR (1912) qui opère en milieu thymolé.

Sous l'influence de la digestion tryptique de la caséine du lait, les plaques d'agar-agar montrent une série de disques clairs, transparents, très nettement visibles sur un fond noir et bordés d'un liseré blanc opaque. On conçoit dès lors, la possibilité de noter d'après cet aspect particulier des plaques, l'action inhibitrice du sérum ajouté à doses croissantes.

Les plaques sont constituées par un mélange à parties égales de lait et d'une solution d'agar-agar à 20 %, lequel mélange après avoir été porté à 100° au bain-marie, est versé vers 60° en couches minces d'épaisseur à peu près égale dans des boîtes de Pétri. Les plaques séchées, d'un blanc laiteux doivent être employées assez rapidement.

Le reste de la technique, la notation, sont identiques à celle des plaques de Lœffler. On emploie une solution extemporanée de trypsine à 1 % et les résultats sont lus après 30 minutes d'étuve à 50°. Il est fait un témoin avec une solution de trypsine pure.

Les résultats auxquels conduit une telle méthode ne peuvent être que des plus irréguliers, la composition du lait étant trop variable par elle-même. De plus, malgré le parallélisme des actions hydrolytique et présurante, on ne saurait envisager l'action antilab comme une action hydrolytique à proprement parler. Enfin même critique qu'aux méthodes précédentes, les données numériques fournies, simple et brutal rapport, ne sont que purement conventionnelles.

5° Méthode à la gélatine. — Indiquée par FERMI ⁽⁶⁶⁾ (1890), employée ensuite par ASCOLI et BEZZOLA ⁽⁸⁻⁹⁾ (1903), JACOBY ⁽¹¹⁷⁾, CARPI ⁽⁴⁶⁾ (1909), KANTOROWICZ ⁽¹³⁸⁾ (1912) (gélatine en plaques), TEALE et BACH ⁽²⁵²⁾ (1920), elle ne semble pas avoir beaucoup retenu l'attention des chercheurs.

La digestion de la gélatine par la trypsine est ici accusée par la perte de la propriété de solidification à froid de cette substance.

ASCOLI et BEZZOLA *partent d'une quantité fixe de trypsine à laquelle ils ajoutent des doses croissantes de sérum*. Après 10 minutes de contact on verse dans chaque tube 3 cc. de gélatine à 3 % additionnée de 1 % de fluorure de sodium. On porte 2 h. 1/2 à 37°, puis à la glacière. Le titre du pouvoir antitryptique est calculé d'après la quantité de sérum capable d'empêcher la liquéfaction. TEALE et BACH partent d'une unité tryptique (plus petite quantité d'une solution de trypsine à 1 % susceptible de liquéfier complètement 1 cc. de gélatine à 15 % en 30 minutes à 37°) à laquelle ils ajoutent des quantités graduelles de sérum, les réactifs étant portés à 37° avant mélange. TEALE et BACH n'ont fait que modifier très légèrement l'unité tryptique définie par LAUNOY en 1918.

KNIASKOFF ⁽¹⁴⁰⁾ (1911) emploie de la gélatine en plaques à 10 % de formol, à laquelle il incorpore de l'encre de Chine.

§ II

MÉTHODES PHYSIQUES

Dans ce paragraphe nous groupons les méthodes basées sur une propriété physique particulière du liquide de digestion.

1° Méthode de la viscosité. — La possibilité d'apprécier au viscosimètre le degré de la digestion tryptique des matières protéiques a suggéré à GOLLA (⁹³⁻⁹⁴) (1909) l'idée d'appliquer cette méthode à l'étude du pouvoir antitryptique du sérum. Employée par EVE (⁶⁵) (1910) et R. WEIL (²⁶⁸) elle repose sur la diminution de la viscosité de la caséine au cours de l'hydrolyse. A un coefficient déterminé de viscosité correspond en effet une proportion toujours constante de substances protéiques coagulables et non coagulables et ce coefficient, fonction du temps de la digestion, de la quantité de ferment et d'antiferment peut nous renseigner sur le degré de la protéolyse atteint dans des conditions bien déterminées.

Technique : On part d'une solution de caséine préparée dans les conditions suivantes :

Caséine	6 gr.
H ² O dist. à 40°.....	30 cc.
Na OH N/10.....	5 cc.

Le mélange est trituré jusqu'à dissolution totale avec 5 gouttes de solution ammoniacale forte. La solution de trypsine employée est une dilution à 0,25 % dans l'eau distillée.

On mélange dans un tube :

Solution de caséine.....	5 cc.
Trypsine	1 cc.
Sérum	0 cc. 08

Après 4 h. 1/2 d'étuve à 40° on refroidit à l'eau courante et on abandonne à la température du laboratoire jusqu'au lendemain. Avant de mesurer la viscosité on ajoute à chaque tube 3 cc. de solution de caséine fraîche. On verse le mélange dans un verre à fond plat et on lit au viscosimètre d'Oswald.

2^o Méthode de la conductibilité électrique. — GOLLA et HUGH WANSEY BAYLY (²⁶⁶) (1909) à la suite des travaux de V. HENRI et LARGUIER DES BANCELS (¹⁴⁸) qui avaient appliqué cette méthode à l'étude de l'hydrolyse de la gélatine et de la caséine, ont trouvé dans les variations de la conductibilité électrique au cours de la protéolyse une méthode assez pratique d'étude du pouvoir antitryptique des sérums.

La technique de ces auteurs est la suivante : Le mélange : caséine-formolée 5 cc., sérum 0 cc. 5, solution à 10 % fraîchement préparée de pancréatine 2 cc. 5, est porté 4 heures 1/2 à l'étuve ; après ce temps on détermine la conductibilité de la solution. Les expériences sont répétées deux fois et les résultats obtenus sont consignés après correction de la conductibilité du récipient.

BAYLY utilise la même notation que celle dont on se sert pour l'indice opsonique et représente la conductibilité normale par le chiffre 1. GOLLA indique ses résultats par les signes + et —.

3^o Méthode réfractométrique de Brailsford Robertson et Samuel Hanson (1918). — Cette méthode toute récente (²¹⁶) dont la précision ne saurait être méconnue retiendra plus longuement notre attention. Elle repose sur le principe suivant : l'indice de réfraction d'une solution des produits de l'hydrolyse tryptique de la caséine étant identique à celui de la solution originale de caséine et la digestion tryptique n'apportant ainsi aucune modification de cette propriété physique du liquide de digestion, il est possible de déterminer, par la réfractométrie, après précipitation de la caséine non digérée, le degré de l'hydrolyse dans un temps donné en présence et en l'absence de sérum et par cela même le pouvoir empêchant de ce dernier.

Technique. — La solution de caséine est préparée le jour même de son emploi avec une caséine commerciale, purifiée par lavages à l'eau, à l'alcool et à l'éther et dans la proportion de 1 g. 50 pour 25 cc. de soude 0,048 N. Il est fait usage d'une solution de trypsine à 1 % dans une solution de $\text{Co}^3 \text{Na}^2$ à 0,01 %. Le sérum frais et très peu hémolysé (*) est dilué à la concentration désirée avec une solution de NaCl à 6 %.

(*) Disons qu'il est grandement préférable que le sérum ne renferme aucun pigment d'hémolyse.

On emploie pour chaque sérum à étudier 3 tubes que nous appelons : *a*, *b*, *c*.

Dans le premier tube *a* on introduit 0 cc. 125 de sérum dilué, et dans les deux autres *b* et *c* 0 cc. 125 de solution NaCl à 6 %. On ajoute dans chaque tube 1 cc. de solution de caséine à 6 % et 0 cc. 125 de trypsine à 1 %. Le contenu d'un des tubes témoin *c* est immédiatement acidifié par addition de 0 cc. 125 d'acide acétique à 0,6 N. (sensiblement 35 cc. d'acide glacial $\frac{0}{100}$) qui arrête toute action tryptique et précipite la caséine. Les tubes *a* et *b* sont portés à 36° pendant une heure et les mélanges qu'ils renferment acidifiés comme précédemment. Après agitation, le précipité est séparé par centrifugation. La détermination de l'indice de réfraction de chaque liquide est effectuée au même moment et à la même température avec le réfractomètre de PULFRICH (l'angle de réflexion totale étant inférieur à 1 minute et la flamme au sodium étant prise comme source lumineuse).

La différence entre les indices de réfraction des mélanges *b* et *c* donne le degré de l'hydrolyse attribuable à la quantité totale de trypsine ajoutée et agissant pendant 1 heure à 36°. La différence entre les indices des tubes *a* et *c* représente la proportion de caséine digérée par la trypsine agissant en présence de sérum dans les mêmes conditions de temps et de température.

Sachant que 1 gr. de caséine ou de ses produits d'hydrolyse dissous dans 100 cc. d'alcali dilué produit un changement de l'indice du solvant égal à 0,00152, il est facile d'obtenir le pourcentage de caséine digérée dans les deux cas, sans sérum et en présence de sérum, en divisant par ce dernier chiffre les différences d'indices entre *b* et *c* et *a* et *c*.

Les globulines du sérum étant précipitées en même temps que la caséine par addition d'acide acétique, il est fait usage d'une solution de NaCl à 6 % dont l'indice de réfraction est, aux erreurs d'expérience près, égal à celui du sérum privé de ses globulines.

Les auteurs insistent sur la nécessité de suivre l'ordre indiqué pour effectuer les mélanges. Si la trypsine et le sérum sont mis en contact avant l'addition de la caséine, on obtiendrait des résultats irréguliers et infidèles.

Connaissant ainsi le degré de la digestion en présence et en l'absence de sérum, les vitesses de l'hydrolyse dans chacun des deux cas seront

obtenues en appliquant avec les valeurs précédemment trouvées la formule générale des réactions mono-moléculaires.

$$\log \frac{a}{a-x} = K t$$

a = concentration initiale en caséine.

x = quantité digérée pendant un temps t .

On obtient ainsi :

k : vitesse d'hydrolyse normale sans sérum.

k_1 : vitesse d'hydrolyse en présence de sérum après qu'une partie de la trypsine a été neutralisée par l'antitrypsine.

La valeur de K ainsi donnée par la précédente formule est, comme dans les réactions habituelles de catalyse, directement proportionnelle à la concentration en trypsine active (non fixée) dans le digesté, il s'ensuit que :

$$\frac{k_1}{k} = (1-T), \text{ T étant la proportion de trypsine considérée comme}$$

neutralisée par le sérum par rapport à une quantité donnée de trypsine prise comme unité. Les auteurs ont déterminé cette valeur de K dans des mélanges variés de caséinate de soude, trypsine et antitrypsine, et noté les relations quantitatives que l'on obtient entre la trypsine et l'antitrypsine d'une part, et la quantité de trypsine inactivée d'autre part.

Selon les auteurs, la réaction trypsine-antitrypsine étant réversible, on calculera dans la pratique l'index antitryptique C au moyen de l'équation d'équilibre

$$\frac{T}{A(1-T)} = C., \text{ dans laquelle } A \text{ repré-}$$

sente la dilution de sérum employée, le sérum non dilué étant pris comme unité.

L'index antitryptique C , donné par cette constante C , indique le nombre de molécules d'antitrypsine contenues dans un volume donné de sérum.

La neutralisation de la trypsine par l'antitrypsine serait due à la formation d'un complexe inactif au point de vue protéolytique : la conception la plus simple que l'on pourrait se faire de ce processus consisterait en la combinaison molécule à molécule des corps en

présence. L'application de la loi d'action de masse donne la relation suivante :

$k \propto (A - \beta T) (1 - T) = T$, dans laquelle :

α désigne le nombre de molécules d'antitrypsine contenue dans la quantité spécifiée de sérum non dilué ;

β désigne le nombre de molécules du complexe trypsine-antitrypsine qui doit être formé par la neutralisation de toute la trypsine employée.

K est une constante de la réaction.

L'équation peut s'écrire ainsi modifiée.

$$\frac{T}{(A - \beta T) (1 - T)} = C$$
, où C est la constante proportionnelle à la concentration moléculaire en antitrypsine dans l'exemple de sérum employé.

L'expérience montrant que l'expression suivante $\frac{T}{A(1-T)}$ est constante, βT est évidemment négligeable par comparaison avec A . En d'autres termes le nombre de molécules du complexe trypsine-antitrypsine qui doit être formé par la neutralisation de toute la trypsine présente, peut-être négligé par rapport au nombre total de molécules d'antitrypsine contenues dans le sérum. D'après les auteurs, une petite fraction de l'antitrypsine du sérum serait engagée en liaison avec les quantités de trypsine employées et l'antitrypsine se trouverait en grand excès dans le sérum.

Nous donnons à titre d'indication les valeurs de C trouvées par les savants américains pour les quantités suivantes, Q : de sérum (sérum de Lapin) :

Q	C
0 cc 50	3,55
0 cc 33	3,25
0 cc 25	3,14
0 cc 13	2,10
0 cc 06	2,59

Des méthodes physiques exposées ainsi d'ailleurs que de l'ensemble de toutes les autres, cette dernière est, sans contredit, celle dont la précision saurait le moins être mise en doute. Malgré sa complexité

apparente elle semble présenter d'incontestables avantages qu'il ne nous a pas été donné d'apprécier pleinement par une plus longue pratique de notre sujet.

§ III

CRITIQUE GÉNÉRALE DES PRÉCÉDENTES MÉTHODES

On voit combien ces méthodes sont diverses, combien sont variés les tests qu'elles utilisent et les conditions dans lesquelles elles se placent. Aussi les résultats obtenus se sont-ils pas, pour la plupart du temps comparables entre eux ; on conçoit aisément qu'en présence de réactifs si dissemblables on soit arrivé parfois dans l'étude de ces phénomènes à des résultats tout à fait opposés. Il semble que dans toutes ces méthodes, exception faite de la méthode de ROBERTSON et HANSON, on ait méconnu les lois d'action des diastases.

1^o La relation qui existe entre le temps de la digestion et la quantité de proté^{ines}es digérées n'est pas le fait d'une simple proportionnalité. LAUNOY l'a montré en particulier pour l'hydrolyse tryptique de la gélatine, hydrolyse qui progresse rapidement pendant les quatre premières heures de digestion, puis plus lentement de la 4^e à la 6^e. A ce moment l'acidité acquise par le milieu est égale à la moitié de ce qu'elle sera à la 24^e heure. Dès la 6^e heure la vitesse de réaction est donc considérablement diminuée. La cause de ce ralentissement tient autant à l'affaiblissement du ferment qu'à l'acidité du milieu.

2^o Le degré de la digestion dans un temps donné n'est pas directement proportionnel à la masse du ferment, pas plus que l'action empêchante du sérum n'est directement proportionnelle à la masse du sérum. La loi des multiples quoique le prétendent K. MEYER (¹⁷⁷), RUSZNIAK (²³¹) n'est pas applicable à l'action du sérum sur la trypsine et de ce fait les données numériques fournies par les précédentes méthodes ne peuvent avoir qu'une signification purement conventionnelle.

Nous n'en voulons pour preuves que les valeurs données par ROBERTSON et HANSON et les graphiques reproduits au cours de cet exposé. Alors que la présence de Occ. 15 de sérum de Lapin diminue

de moitié l'activité spécifique de la trypsine employée, l'addition de 0 cc. 3 du même sérum, c'est-à-dire d'une quantité double la réduit seulement au tiers. Par contre, entre deux autres essais se faisant immédiatement suite, on notera une chute brusque et importante que les courbes reproduites (p. 78 et 88) traduisent avec la dernière évidence.

Il n'est pas non plus sans intérêt de rappeler ici qu'une certaine inhibition étant réalisée, on ne la dépasse pas quelles que soient dans la suite les additions de sérum successivement effectuées (YOUNG (²⁸⁰), LAUNOY (¹⁵³⁻¹⁵⁴)), on peut même voir dans certains cas la courbe d'hydrolyse se redresser légèrement, après être passée par un minimum. Ces considérations auxquelles s'ajoutent les critiques de détail précédemment faites à la suite de chaque technique, infirment donc singulièrement d'une façon générale, la valeur des précédentes méthodes. On ne saurait oublier non plus de quelle façon plus ou moins arbitraire les conditions de temps et de température ont été le plus souvent fixées. Pour toutes ces raisons, on ne doit accorder aux résultats auxquels elles conduisent aucune valeur objective et ne leur prêter qu'une simple valeur qualitative.

§ IV

MÉTHODE DE L. LAUNOY

On ne saurait adresser les mêmes critiques à la technique proposée par L. LAUNOY (¹⁵³⁻¹⁵⁴). Dans cette méthode qui repose sur des données plus précises et une connaissance plus parfaite des actions diastasiques, le test d'épreuve est constitué par de la gélatine. L'impureté de ce produit, argument que l'on a souvent opposé à son emploi, ne peut, comme nous le verrons dans la suite, être ici invoquée. On ne saurait pas plus arguer par ailleurs de l'inégalité d'action de la gélatine et de la trypsine, la mesure de l'activité de l'une pouvant, dans le cas présent, être parfaitement substituée à la mesure de l'activité de l'autre. La concordance des résultats obtenus avec l'ovalbumine et la gélatine comme tests affirme pleinement cette manière de voir. L'extrême sensibilité de cette dernière aux actions tryptiques l'indique de plus tout particulièrement pour l'étude des phénomènes antidiastatiques.

Principes. — 1^o La disparition de la propriété de gélification à froid constitue le premier indice de l'attaque de la gélatine par la trypsine. Cette liquéfaction corrélative, contrairement à l'opinion généralement admise, de phénomènes d'hydrolyse proprement dits, est plus ou moins rapidement atteinte selon l'intensité de la digestion.

Une des manifestations à la fois des plus nettes et des plus simples, de l'action empêchante du sérum, réside dans la conservation de cette propriété de gélification, action retardatrice dans le cas où le sérum exerce son activité au minimum pendant la première heure de digestion, action inhibitrice ou apparemment telle dans le cas d'une digestion prolongée au cours de laquelle se traduit le maximum de cette action.

Ainsi se trouve déterminée par ce caractère tiré du gel et ces deux données *seuil* et *optimum*, la valeur du pouvoir antitryptique du sérum. L'*optimum* ainsi évalué n'est que l'*optimum approché* car dans la plupart des cas, ainsi qu'on le verra dans la suite, il s'est produit un commencement de digestion.

2^o L'étude des produits de dissociation et surtout de leur réaction, en fournissant des renseignements particulièrement intéressants sur le mouvement de la protéolyse, complète les précédentes indications numériques qui, encore qu'elles ne soient que relatives, permettent déjà à elles seules de caractériser parfaitement un sérum.

La digestion tryptique de la gélatine donne rapidement naissance à des produits acides (LAUNOY). C'est ainsi qu'on peut noter déjà après une heure d'étuve et même avec une faible quantité de trypsine le virage d'une gélatine tournesolée neutre au tournesol. Cette acidité qui progresse rapidement d'ailleurs pendant les 6 premières heures, n'est pas due aux substances étrangères préexistantes (expériences de Launoy avec gélatine non dialysée et gélatine dialysée) mais bien à l'hydrolyse diastasique de la gélatine. Elle doit être rapportée à la présence d'albumoses et de peptones à caractère acide (SIEGFRIED, KRÜGER, MÜLLER...)

A côté de ces corps à caractère d'acides monobasiques, il se forme des amino-acides. Si pour de petites quantités de trypsine, la production de ces derniers est nettement inférieure à celles des précédentes substances, elle se soutient par contre plus longtemps à la vitesse initiale. Pour une plus forte proportion de trypsine, elle leur

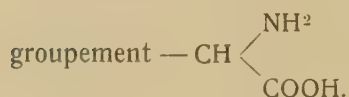
est, par contre non seulement égale, mais supérieure dès le début de la digestion.

Ces phénomènes dans leur ensemble rendent possible une étude plus détaillée et plus rigoureuse de la marche de l'hydrolyse qu'ils vont permettre de suivre par de simples dosages acidimétriques.

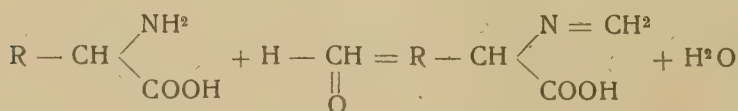
L'acidité libre du milieu gélatine-trypsine au cours de la digestion sera donnée directement par formation de combinaisons sodiques. Par la méthode au formol de SÖRENSEN (^{249 bis}) on sera d'autre part très exactement renseigné sur la quantité de protéines désagrégées au stade d'amino-acides.

Cette méthode rapide qui permet de doser 90 % de l'azote aminé, repose sur une ancienne remarque de SCHIFF qui avait noté que les solutions neutres d'acides aminés prennent une réaction nettement acide par addition d'aldéhyde formique.

Considérons un acide α aminé renfermant par conséquent le



Ce corps présente une réaction sensiblement neutre, l'acidité du carboxyle étant compensée par la basicité du groupement aminogène. Vient-on à ajouter de la formaldéhyde, il se fait la réaction suivante :



La fonction basique NH^2 a disparu : la combinaison méthylénique formée se comporte, par sa fonction acide COOH libre, comme un acide monobasique. Par dosage acidimétrique on titre les fonctions acides et ainsi indirectement les noyaux aminés apparus. La possession de ces deux valeurs, *acidité libre* et *acidité libérable par le formol* permet ainsi d'établir le mouvement de l'hydrolyse que, d'après les graphiques donnés par LAUNOY, on peut considérer en fait comme éteinte au bout de 18 heures.

En présence de sérum la marche des phénomènes est modifiée : l'acidification du milieu est alors variable. Pour un sérum donné, elle est en raison inverse de la quantité de sérum et pour une quantité

donnée de différents sérums elle est en raison inverse du pouvoir antidiastatique de chacun. La valeur maxima de l'action antitryptique sera donnée non point, sauf exception rare, par la quantité de sérum à laquelle correspond le zéro d'acidification, l'inhibition du ferment par le sérum n'étant pas habituellement réalisée, mais par la quantité de ce sérum pour lequel l'acidité totale acquise au cours d'une digestion de 18 heures est la plus basse. Cette valeur constitue l'*optimum réel*.

TECHNIQUE

Ces principes parfaitement établis, voici quelle est la technique à suivre ; c'est celle qu'avec de légères modifications de détail nous avons appliquée à de très nombreuses déterminations.

1.— Préparation des Réactifs.

Test d'épreuve

Purification. — Elle est des plus importantes et sera obtenue par dialyse à la glacière en présence d'eau distillée neutralisée (phénol-phtaléine comme indicateur) à raison de 70 gr. d'eau pour 1 gr. de gélatine aussi pure que possible. L'eau est renouvelée toutes les 24 h. pendant 7 jours. Ce temps peut être diminué de 24 ou 48 heures en changeant d'eau 2 fois par jour pendant les deux premiers jours. Si la purification n'est pas obtenue dans ce laps de temps, on continue la dialyse qu'il y a intérêt néanmoins à ne pas trop prolonger. Nous avons noté en effet que la gélatine devient par la suite grumeleuse, se désagrège et absorbe une très forte proportion d'eau qu'il faut éliminer ensuite par une évaporation dont on a intérêt à réduire autant que possible la durée. Il faut donc veiller à la température de la glacière.

La purification sera considérée comme terminée lorsque l'eau de dialyse n'est plus acide, ne précipite plus par le chlorure de baryum, l'azotate d'argent, l'oxalate d'ammoniaque, l'acide picrique en solution aqueuse saturée, réactif avec lequel elle réagit le plus longtemps. On ne se prononcera qu'après plusieurs heures de contact entre le réactif et l'eau.

Préparation. — La gélatine ainsi dialysée est fondue au bain-marie dans son eau d'imbibition et la solution ramenée au taux de 10 % par addition d'eau ou légère évaporation. Au cours de la dialyse il y a absorption d'une façon à peu près constante de 9,5 à 10 fois son poids d'eau ; il se produit de plus un départ notable d'acidité qui, pour 50 gr. de gélatine est de l'ordre de 5 cc. de solution Na OH N.

La neutralisation est ensuite faite de telle façon que la gélatine neutre au tournesol reste acide à la phénol-phtaléine, acidité égale à 0 cc. 15 Na OH N/10 pour 5 cc. de solution de gélatine à 10 %. Après cette addition d'alcali, qui a pour effet de l'éclaircir, la solution est filtrée au papier Chardin à 45° et répartie dans des flacons que l'on stérilise à 105° pendant 10 minutes et conserve ensuite à la glacière.

Le test d'épreuve préparé dans les conditions précédemment indiquées est constitué par 2 cc. de gélatine dialysée (mesurée à 45°) en solution à 10 %, acide à la phénol-phtaléine dans les limites de 0 cc. 5 à 0 cc. 07 de solution Na OH N/10 pour 2 cc. Il se gélifie au sortir de l'étuve à 41°, en 1 à 2 minutes à 10° et en 4 à 6 minutes à 20°.

Solution tryptique - son titrage

Par un essai préliminaire on se renseigne d'abord sur la valeur du ferment dont on fait une macération à 0,50 % dans l'eau physiologique, 24 h. à la glacière. La macération est filtrée sur papier, puis sur bougie Chamberland et répartie dans des tubes que l'on scelle à la lampe et conserve à la glacière.

Dans nos expériences nous avons fait usage d'une trypsine de Porc préparée comme suit :

Pancréas de Porc broyé	1.000 gr.
Glycérine	500 cc.
Eau physiologique	500 cc.
Eau distillée	500 cc.
Chloroforme	25 cc.

Le mélange est laissé deux jours à la glacière et filtré à l'étamine. On précipite par l'acétone : le précipité est repris avec 1.000 cc. d'une

solution de carbonate de soude Solvay à 2,5 ‰. On agite et reporte à la glacière. La solution est filtrée sur papier Chardin et reprécipitée par le mélange alcool absolu-éther. Après dessiccation du précipité sur l'acide sulfurique dans le vide, on obtient 7 gr. d'une poudre se dissolvant rapidement et presque totalement dans l'eau physiologique et répondant à l'analyse suivante :

Analyse :

Humidité.....	5 gr. %
Cendres.....	11,20 %
Teneur en zinc	0,40 %

Les solutions préparées à partir de cette trypsine conservée en tubes scellés dans la caisse à glace, se sont montrées extrêmement actives. Au moment de l'obtention du ferment la dilution à 1 ‰ digérait totalement en 30 minutes à la dose de 0 cc. 1 l'unité de test.

Le titrage de cette solution mère est des plus importants et il y a intérêt à le refaire au moment de l'emploi :

On établit avec de l'eau physiologique une série de dilutions dont on fait agir 0 cc. 1-0 cc. 2 sur l'unité de test. On complète à 1 cc. avec de l'eau physiologique. Les essais établis en double sont portés à l'étuve à 41° pendant 45 et 60 minutes.

Unité tryptique.—Elle est donnée par la dilution qui à la dose de 0 cc. 1—0 cc. 2, liquéfie en une heure l'unité de test précédemment définie et ne la liquéfie pas totalement en 45 minutes. Ainsi qualitativement fixée, cette unité détermine par ailleurs sur ce même test en 18 heures à 41° une acidité totale acquise neutralisée par 1 cc. 2-1 cc. 3, de solution Na OH N/10.

Il arrive dans certains cas, et nous l'avons noté assez fréquemment, que la corrélation entre ces deux phénomènes, liquéfaction et acidification, n'est pas toujours aussi étroite. C'est ainsi que pour une unité qui répond au premier caractère, les valeurs de l'acidité acquise peuvent dépasser celles précédemment mentionnées (1 cc. 5-1 cc. 6). Par ailleurs pour une acidité totale rentrant dans les limites habituelles, la liquéfaction du test n'est parfois pas totalement obtenue dans l'unité de temps. Cette absence d'absolu parallélisme entre deux actions mesurées à des temps différents (début et fin de la digestion) et qui, de plus ne progressent vraisemblablement pas à la même

vitesse, n'a rien pour nous surprendre ; elle ne saurait par ailleurs infirmer la méthode envisagée. En cette occurrence, il y aura lieu de vérifier la réaction primitive du test. Pour de faibles différences dans la concentration en ions H d'une part et à fortiori dans la concentration en gélatine, la marche des phénomènes hydrolytiques se trouve modifiée. Il est de toute évidence que dans la détermination de l'unité tryptique c'est la valeur tirée de l'acidité qui devra primer sur l'autre : elle constitue une valeur beaucoup plus précise et d'ailleurs indispensable pour l'établissement des graphiques.

2.— Réaction proprement dite.

En possession des précédents réactifs, on procède aseptiquement aux opérations suivantes : 1° On répartit dans des tubes soigneusement lavés et stériles des volumes de sérums (sérum de caillot exsudé à la température du laboratoire et aussi peu hémolysé que possible), compris entre 0 cc. 0005 et 0 cc. 3 ou 0 cc. 4, ces limites variant avec l'espèce animale envisagée. Cette répartition est faite au moyen de dilutions à 1/1000^e, 1/100^e, 1/10^e dans l'eau physiologique stérile au moyen de longues pipettes divisées en dixièmes de cent. cube et donnant 3 gouttes au dixième.

2° On ajoute l'unité tryptique (0 cc. 1 ou 0 cc. 2) et on complète à 1 cc. avec de l'eau physiologique.

3° On laisse en contact 15 minutes environ à la température du laboratoire de façon à favoriser les phénomènes d'adhésion (?) et on ajoute au mélange sérum-trypsine 2 cc. de gélatine test mesurée à 45°. Après agitation des tubes, on les porte à l'étuve à 41°.

Déterminations tirées du gel

Seuil. — Après une heure de séjour à 41°, les tubes comportant des quantités de sérum égales ou inférieures à 0 cc. 01 sont retirés de l'étuve et plongés dans un bain d'eau à 10°. On note après 15 minutes le premier essai présentant le phénomène de gélification : il donne la valeur du seuil, c'est-à-dire la plus petite quantité de sérum capable de retarder l'action liquéfiante de l'unité tryptique pendant la première heure de digestion.

Optimum approché. — Après 18 heures d'étuve, (temps maximum de l'action tryptique) on retire les autres tubes que l'on plonge immédiatement dans un bain d'eau à 20°. *La plus petite quantité de sérum capable de conserver dans ces conditions à l'unité de test, la propriété de se prendre en un gel solide, stable, en 10 minutes constitue l'optimum approché.*

Détermination tirée de l'acidité

Dans les essais laissés 18 heures à l'étuve on titre l'acidité totale acquise, opération que l'on peut faire en deux temps.

a) **Titration de l'acidité libre.** — On additionne chaque tube de 2 ou 3 gouttes de solution alcoolique de phénol-phtaléine à 1 % et on titre avec la solution de Na OH N/10 ou mieux N/20 jusqu'à virage au violet faible.

b) **Titration de l'acidité formol.** — A l'essai précédemment effectué on ajoute, 10 cc. de solution au 1/2 d'aldéhyde formique à 40 %, solution préalablement neutralisée jusqu'à un virage rose pâle à la phénol-phtaléine.

En pratique, la recherche de l'acidité totale faite de l'acidité libre de l'acidité formol, est directement obtenue par un seul titrage. L'acidité totale acquise est tirée de l'acidité totale diminuée de l'acidité libre et de l'acidité formol préexistantes dans le test et le sérum en présence.

Ces derniers éléments permettent de construire le graphique de la protéolyse en présence de quantités variables de sérum sanguin. On porte en ordonnées les quantités de NaOH N/10 nécessaires à la neutralisation totale de chaque essai et en abscisses les quantités de sérum. (Cf. p. 78 et 88).

Dans la lecture de ces graphiques dont l'analyse permet d'apprécier par comparaison la valeur de plusieurs sérums, trois points importants sont à considérer :

- 1° Le taux d'acidification en présence de 0 cc. 01 de sérum.
- 2° Les points critiques des essais pour lesquels il y a une chute importante de l'acidification.
- 3° L'acidité la plus basse obtenue.

La courbe ainsi établie en fonction de la quantité de sérum et à la période terminale de l'action peut être complétée par une autre

non moins intéressante représentative du mouvement de la protéolyse dans le temps pour un volume donné de sérum. Cette intervention de la notion de temps est du plus grand intérêt pour le classement définitif de plusieurs sérums à l'étude (p. 76).

L'ensemble des données fournies par cette méthode (seuil, optima, graphiques) permet d'apprécier d'une façon rigoureuse le pouvoir antitryptique du sérum. De réalisation assez facile, cette technique est celle que nous avons appliquée dans l'étude de nombreux sérums (Homme, Cobaye, Lapin), avec des résultats parfaitement constants.

La recherche de ces diverses valeurs nous a permis avec LAUNOY de classer ainsi les sérums suivants : Cobaye, Homme, Cheval, Mouton, Chien, Lapin, Poule. L'examen du tableau ci-dessous nous permet de mettre à peu près sur la même place (à quelques légères variations individuelles près) les sérums de Cobaye, Homme, Cheval, Mouton. Le sérum de Lapin se montre moins antitryptique et surtout peu constant.

Sérum	Seuil	Optimum approché	Optimum réel
Cobaye . .	(0,0005-0,002)	(0,05-0,07)	(0,07-0,1)
Homme . .	(0,001 -0,002)	(0,04-0,07)	»
Cheval . .	(0,001 -0,002)	(0,05-0,07)	»
Mouton . .	0,002	0,06	»
Chien . .	0,002	(0,07-0,08)	»
Lapin . .	(0,002 -0,003)	(0,1 -0,16)	
Anguille . .	0,002	(> 0,1)	
Poule . .	0,002	(0,3 -0,4)	

Tableau 2

Dans les expressions numériques ci-dessus, deux nombres, entre parenthèse, indiquent les variations individuelles trouvées dans une même espèce.

Immunisation.— Action antitryptique du sérum préparé

La plupart des auteurs à l'exception de BAUER ⁽¹²⁾, YOUNG ⁽²⁸⁹⁾, et WAGO ⁽²⁸⁴⁾ ont noté une augmentation de l'indice antitryptique à la suite d'injections de trypsine. Les observations de FERMI et PERNOSSI ⁽⁷¹⁾, CAMUS et GLEY ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾, PUGLIÈSE et COGGI ⁽²⁰⁹⁾, ont été vérifiées par ACHALME ⁽²⁾ qui obtint par injections dans le muscle pectoral de l'Oie et dans le péritoine du Cobaye un sérum qui

dans ce dernier cas neutralisait "in vitro" jusqu'à 8 fois son volume de solution tryptique alors que le sérum de Cobaye neuf n'inhibait que son volume de solution fermentaire, LANDSTEINER (¹⁴⁷), KURT MEYER (¹⁷⁷), JOCHMANN et KANTOROWICZ (¹³³), VON BERGMANN et BAMBERG (¹⁹) ont été conduits à des résultats du même ordre à la suite d'injections sous-cutanées chez le Lapin ou d'implantation aseptique dans la cavité abdominale d'un Chien, du pancréas d'un autre Chien. Ces derniers chercheurs ont de plus noté la faible durée de cette augmentation, la précocité de son apparition (après 24 heures) que GLAESSNER (⁹¹) aurait même observée le jour de l'injection, autant de faits confirmés dans la suite par STÉVENIN (²⁵¹), WEINBERG et RUBINSTEIN (²⁷⁷). SAMUEL HANSON (¹⁰³) dont les expériences sur le Lapin injecté par voie intraveineuse ou sous-cutanée semblent avoir été conduites avec toute la rigueur désirable, observa de même, avec des variations individuelles parfois assez considérables, une augmentation incontestable de l'indice antitryptique (deux fois sur six). Au début après la première ou seconde injection il se produirait une baisse marquée suivie d'une élévation brusque qui ne dépasserait pas de 300 % les variations normales. Le pouvoir antitryptique se maintiendrait à ce niveau pendant une période assez courte (quelques jours) pour revenir ensuite à la normale, même si l'on continue les injections de trypsine.

D'après BRIEGER et TREBING, COBLINER (⁵²), l'ingestion de trypsine serait aussi susceptible de provoquer une augmentation de ce même pouvoir.

Spécificité de l'action antitryptique.

C'est là une question de première importance que les physiologistes n'ont pas manqué de se poser dès le début et qu'il convient pour une plus exacte interprétation des faits de scinder en deux parties. Il ne semble pas en effet que l'on doive aboutir à des conclusions tout à fait du même ordre selon que l'on envisage l'action antitryptique du sérum normal ou du sérum préparé.

En ce qui concerne le sérum normal, cette action ne paraît pas revêtir une allure d'absolue spécificité pour la trypsine de l'animal

fournisseur de sérum. Nous avons vu en effet les sérums les plus divers exercer à des degrés variés, il est vrai, leur influence sur une même trypsine de Porc. Pour DELEZENNE même ⁽³⁵⁾ (1903) le sérum sanguin qui se montre le plus empêchant vis-à-vis de la kinase d'une espèce animale déterminée ne serait pas celui de cette même espèce ; ce serait le sérum de Chien qui inhiberait le moins, d'après lui, la kinase de cet animal. Vérifiées par OPIE et BARHER ⁽¹³⁸⁾ (1907) à propos des antileucoprotéases et KURT MEYER ⁽¹⁷⁷⁾ (1910), ces données d'un intérêt particulier demanderaient, croyons-nous, à être confirmées par de nouvelles expériences différemment conduites et ceci d'autant plus que les observations de GLAESSNER ⁽⁹¹⁾ (1903), JOCHMANN et KANTOROWICZ ⁽¹³³⁾ (1908), LANDSTEINER ⁽¹⁴⁷⁾ (1909), s'opposent totalement aux conclusions des précédents auteurs. Nous ralliant aux opinions de ces derniers expérimentateurs nous estimons, pour notre part, que c'est sur la trypsine provenant de la même espèce zoologique qu'agit au maximum le sérum sanguin d'un animal donné. Cette action, comparable en sorte à celle que nous reconnaitrons dans la suite aux antiprotéases bactériennes, s'exercerait ainsi, en raison d'une certaine identité de ces diverses trypsines en dehors de l'Espèce, dans le champ plus vaste de la Classe. Ne pourrait-on arguer en effet à l'appui de cette opinion, de la faible activité que manifeste le sérum de Poule vis-à-vis de la trypsine de Porc (LAUNOY) ou de la leucoprotéase de Chien (OPIE et BARKER) ? Entre des sérums d'animaux n'appartenant pas à la même Classe (mammifères, oiseaux) les différences d'activité s'accusent ainsi avec une netteté qui ne laisse pas d'être assez singulière et qu'il convient tout au moins de rapporter ici ⁽¹⁾.

A considérer à ce même point de vue l'action du sérum d'un animal préparé, il n'est pas contestable que cette spécificité s'exerce dans un cadre beaucoup plus étroit, LANDSTEINER n'ayant constaté d'augmentation un peu marquée que par rapport au ferment qui avait servi à la préparation de l'animal (Oie).

(1) Il est à noter toutefois que la Poule se classe parmi les granivores et que c'est là une condition d'existence assez inadéquate à déterminer un pouvoir antitryptique élevé. De même l'absence de ferment leucocytaire relevé par ces mêmes auteurs chez les oiseaux pourrait rendre compte, dans une certaine mesure de l'extrême faiblesse de l'activité antifermentaire de ces sérums.

Pouvoir antitryptique des divers liquides organiques

Cette étude ne serait pas complète si nous ne mentionnions de façon très succincte tout au moins, le passage éventuel des substances antitryptiques dans les divers liquides de l'organisme. Signalée d'une façon assez constante dans le liquide d'œdème, le liquide d'ascite et surtout le liquide pleural, leur apparition ne serait qu'exceptionnelle (hémorragie cérébrale) dans le liquide céphalo-rachidien qui normalement ne renferme ni ferment protéolytique, ni antiferment (CHIAROLANZA, ⁽⁵⁰⁾, DOCHEZ ⁽⁶⁰⁾, E. MÜLLER ⁽¹⁰⁰⁾.

L'urine normale ne contient pas d'antitrypsine (MÜLLER (1907), WEINBERG et LAROCHE ⁽²⁷³⁾ (1909). DÖBLIN ⁽⁵⁰⁾ (1909) prétendrait cependant avoir trouvé un antiferment thermostable que, d'après BAUER ⁽²⁾ on ne saurait rapprocher de l'antitrypsine du sérum. La présence d'antitrypsine serait toutefois de règle dans l'albuminurie (WEINBERG et LAROCHE, STEVENIN) et aucun rapport n'existerait par ailleurs entre l'indice de l'urine et celui du sérum.

Rapports du pouvoir antitryptique avec les autres propriétés du sérum. — Des expériences de BERGMANN et MEYER ⁽²⁰⁾, WEINBERG, STEVENIN, il résulte qu'il n'y a aucune relation entre le pouvoir antitryptique du sérum et sa teneur en substances hémolytiques.

De même on n'observe aucun parallélisme entre l'action empêchante du sérum vis-à-vis de la trypsine et son pouvoir antiprésurant ou anti-peptique (ZUNZ ⁽²⁰¹⁾, VON BERGMANN et MEYER, EISNER).

Il n'est pas par contre sans intérêt de relater une propriété particulière propre aux sérums antitryptiques. ACHALME (1901) et VON BERGMANN ⁽¹⁸⁾ (1906) ont noté que les sérums d'animaux (Cobaye, Lapin, Chien) immunisés contre la trypsine exerçaient une protection des plus nettes contre la lésion nécrotique locale et la réaction générale, consécutives à l'injection du ferment. Nous retrouverons plus loin, à propos d'autres diastases, cette action neutralisante, antitoxique du sérum : elle rendrait compte (?) d'après OPIE et BARKER, étant donnée la coexistence chez le Lapin de leucoprotéase faible et d'anti-leucoprotéase très active, de l'absence chez cet animal de suppuration typique avec liquéfaction des tissus.

IV.— ACTION ANTILEUCOPROTÉASIQUE

L'action que le sérum exerce vis-à-vis du ferment leucocytaire doit être rapprochée de l'action antitryptique avec laquelle l'opinion des auteurs est unanime à la confondre.

La sécrétion d'une substance tryptique entrevue par NAUNYN (1865) qui constata dans le pus la présence de leucine, tyrosine, xanthine et guanine a été en effet des plus nettement confirmée par ACHALME (1890), LEBER (1891), F. MÜLLER (1902), MÜLLER et JOCHMANN (¹⁹¹) (1906), JOCHMANN et KANTOROWICZ (¹³³) (1908) qui réalisèrent une augmentation du pouvoir antitryptique aussi bien à partir de ferment leucocytaire qu'à partir de trypsine. STEVENIN (1911) obtint de même une élévation de l'antitrypsine chez des Lapins injectés dans le péritoine avec de l'extrait de leucocytes. L'identité de ces deux substances, indifféremment prises par ailleurs comme tests d'épreuve et avec des résultats, tout à fait comparables dans la détermination de l'action antitryptique, rend compte de ce fait que certaines espèces animales presque dépourvues de ferment leucocytaire (Lapin, Cobaye) possèdent un sérum qui se montre néanmoins plus ou moins empêchant vis-à-vis de la digestion par le pus humain. Il est à noter de même que la très faible activité manifestée vis-à-vis de la leucoprotéase de Chien par le sérum d'oiseaux (Pigeon, Poule) chez lesquels on relève l'absence dans les leucocytes, la moelle osseuse, la rate d'une enzyme analogue, est corrélative d'un pouvoir antitryptique peu marqué.

De plus, d'après JOCHMANN et KANTOROWICZ, le chauffage du sérum à 60° entraverait dans une notable mesure son pouvoir empêchant vis-à-vis de ces deux ferments. Ce sont là autant de raisons qui doivent nous faire considérer les actions antileucoprotéasique et antitryptique sinon comme totalement identiques du moins comme très proches l'une de l'autre.

V.— ACTIONS ANTIACTINODIASTASIQUE ET ANTIAMIBODIASTASIQUE

Le sérum sanguin exerce sur les diastases des Actinies (MESNIL (¹⁷²), des Amibes, des Infusoires (MESNIL (¹⁷³), MESNIL et MOUTON (¹⁷⁴) une action antiprotéolytique sensiblement du même ordre que celle

reconnue vis-à-vis de la trypsine. Ces auteurs ont étudié avec la gélatine comme test les sérums de Chèvre, Mouton, Cobaye, Lapin, Homme, Chien... (par ordre d'activité décroissante) et noté les principaux caractères de cette action.

VI. — ACTION DU SÉRUM SUR LES PROTÉASES MICROBIENNES

Nous avons réservé pour un chapitre spécial l'étude de l'action du sérum sur les protéases bactériennes ; dans la classification que nous avons adoptée elle trouve ici sa place. En raison du développement particulier que nous avons donné à cette importante question sur laquelle nos expériences ont plus spécialement porté, nous avons cru bon de la développer dans un chapitre placé en fin d'ouvrage (p. 91).

B. — Action du sérum sanguin sur les diastases hydrolysantes des produits de dédoublement des matières protéiques

En dehors des diastases hydrolysantes des matières protéiques précédemment étudiées, l'action empêchante du sérum s'exerce à des degrés divers, à l'état normal ou à la suite d'injections préparantes à l'égard d'autres diastases hydrolysantes : uréase, dextrinase. émulsine...

ACTION ANTIURÉASIQUE DU SÉRUM

A cette question se rattachent les noms de MOLL (¹⁸⁴) (1902) en ce qui concerne l'uréase animale, celui de P. CARNOT (⁴⁵) et de ses collaborateurs GÉRARD et Mlle MOISSONNIER pour ce qui a trait à l'uréase végétale.

Antiurée animale. — *Sérum normal.* — C'est MOLL qui a établi l'action empêchante du sérum normal sur cette diastase hydratante de l'urée qu'elle transforme en carbonate d'ammoniaque. Le ferment employé par cet auteur était obtenu à partir de *Micrococcus ureæ* ense-

mencé sur bouillon, 8 jours à 35°. La précipitation par l'alcool fournit une poudre qui, desséchée, dédoublerait en 72 heures à 35° jusqu'à 94 % de l'urée. Le dosage de l'ammoniaque par la méthode de SCHLÆSING ne serait pas indiqué et il serait préférable de déterminer quantitativement l'urée non dédoublée par le procédé de MÖRNER SJOEQUIST.

L'auteur indique la possibilité de partir d'un ferment uréasique extrait du *Staphylococcus pyogenes aureus* lequel montre une activité fermentaire comparable. Le *Bactérium coli* et le *Proteus vulgaris* donneraient aussi à l'encontre du *Streptococcus pyogenes* des résultats positifs.

L'action antiuréasique du sérum normal de Lapin agissant sur 10 cc. de sol. d'urée à 2 % additionné de 1 cc. sol. de fluorure de sodium, aurait été vérifiée avec des variations individuelles 13 fois sur 16 cas par l'auteur.

Sérum préparé. — Etant donnée la haute toxicité du ferment, MOLL n'a pu dépasser 0 g. 05 par injection (injections sous-cutanées quotidiennes), les animaux présentant tous de l'amaigrissement. Dans quatre cas sur cinq une augmentation très nette a pu être constatée ; dans deux cas le pouvoir empêchant avait doublé après 14 injections, dans un cas il n'accusa qu'une augmentation de 1/3 alors que le sérum du 4^e animal, pas antiuréasique normalement, se révéla très empêchant dans la suite. Aucune modification ne fut notée (expériences de contrôle) pas plus chez des animaux injectés de ferment inactivé par chauffage à 100° que chez d'autres injectés avec des cultures vivantes ou du bouillon stérile.

Antiuréase végétale. — Vis-à-vis du ferment végétal de l'uréase du Soja (*Soja hispida*) il n'a pu, par contre, être mis en évidence de pouvoir empêchant du sérum qui manifesterait au contraire, en solution diluée, une action nettement protectrice vis-à-vis de la diastase. Cette action indépendante de la teneur en sels minéraux, de l'alcalinité du sérum, ne serait pas due non plus à une substance thermolabile à 65° ; elle serait, d'après les auteurs, d'ordre purement physique ou physico-chimique et s'opposerait de par le mécanisme de son action à l'action antidiastasique très nette du milieu sanguin vivant.

Les injections quotidiennes ou tri-hebdomadaires de ferment, pratiquées chez le Chien à diverses doses par la voie sous-épidermique, n'ont amené aucune modification du sérum tant au point de vue urolytique, qu'au point de vue antidiastasique. Aucun état d'immunisation n'aurait de même été créé, le Chien ainsi préparé succombant après injection de la dose mortelle minima, avec la même rapidité et les mêmes symptômes que ceux notés chez un animal neuf : le même insuccès aurait été observé à la suite d'injections intraveineuses, insuccès attribué par CARNOT au peu de diffusion de la diastase dans le milieu sanguin.

Il semble donc, qu'il n'y a pas ici production d'antidiastase, ou dans de si faibles proportions qu'elle est dans tous les cas masquée par le renforcement du pouvoir fermentaire dû au milieu albumineux du sérum. Telle est du moins l'opinion du précédent auteur.

C. — Action du sérum sur les diastases hydrolysantes des sucres et des glucosides

ACTION ANTIAMYLASIQUE

Après avoir établi (¹¹¹) (1890) que le sérum sanguin normal n'exerce pas d'action empêchante sur l'invertine, ferment extrait de la levure qui dédouble le saccharose en deux sucres fermentescibles et de l'amylase ou plus exactement de la dextrinase, diastase saccharifiante extraite du malt et qui transforme l'amidon en maltose, HILDEBRANDT a montré par contre (¹¹²) (1893) la possibilité d'obtenir, chez le Lapin, par voie d'immunisation (voie rectale) des sérums capables de réduire cette dernière saccharification (transformation en sucre ramenée de 60-80 à 20-30 %). GESSARD (⁸⁸) (1906) a vérifié les conclusions de cet auteur en ce qui concerne le sérum normal et mesuré l'action antiamylasique apparue chez les Lapins injectés en 7 fois à des intervalles de 6 jours avec 60 cc. d'extrait de malt à 10 % filtré sur bougie. La technique suivie par cet auteur en collaboration avec WOLFF (⁸⁷) est la suivante :

On additionne 12 gouttes de sérum de 20 gouttes d'extrait de malt à 10 % (macération d'une heure à 20°, filtration sur papier et sur bougie). Après cinq minutes de contact on ajoute 25 cc. de solution d'amidon soluble à 2 ou 4 % (la teneur en amidon basée sur le taux présumé de maltose est sans grande importance sur le rendement) neutralisée au méthyle-orange avec la soude. Le mélange est porté 1 heure à 20°, déféqué ensuite au nitrate mercurique et le maltose formé dosé par le procédé de MOHR modifié par G. BERTRAND. Le degré anti-amylasique le plus élevé observé a été de 70 environ, c'est-à-dire qu'il n'y a eu avec le sérum anti que 30 de maltose produit, pour 100 de maltose formé dans les mêmes conditions en présence de sérum normal. Le rendement en maltose serait sensiblement en raison inverse de la quantité de sérum opposé. Vis-à-vis de l'extrait d'orge, l'immunsérum se serait aussi montré empêchant.

ACTION CONTRE L'ÉMULSINE

C'est en étudiant le sort des ferments hydrolytiques dans l'organisme qu'HILDEBRANDT (¹¹²) chercha un mode d'immunisation vis-à-vis de ces ferments, de l'émulsine en particulier. En ce qui concerne l'action saccharifiante de la diastase, le sérum de Lapins préparés à doses progressivement croissantes (0,1 à 0,3 jusqu'à 1 g.) pendant 15 jours, manifeste une action anti aussi nette que celle observée avec l'amylase.

Non moins intéressante est l'action empêchante de ce même sérum vis-à-vis du poison cyanhydrique. L'intoxication cyanhydrique, provoquée habituellement (Lapin normal) en une minute par une injection intraveineuse de 0,03 d'émulsine concomitante d'une injection par la même voie de 0,5 à 1 gr. d'amygdaline, est, dans le cas de l'animal préparé, nettement retardée. Les symptômes n'apparaissent qu'après 5 à 7 minutes. Cette action antitoxique du sérum, correspondant à une neutralisation du ferment "in vivo", avait été notée même à l'état normal par GRÉHANT (⁹⁶) qui observa que la quantité d'amygdaline nécessaire pour tuer un animal d'intoxication cyanhydrique est moindre, dans le cas du mélange effectué "in vitro" du glucoside et du ferment, que dans le cas de l'injection de ces deux substances pratiquée séparément dans l'organisme.

CHAPITRE III

Action empêchante du sérum sur les diastases oxydantes

Action antioxydasique

Du point de vue qui nous intéresse, la tyrosinase et la laccase sont, parmi les ferments oxydants, ceux auxquels à été opposée l'action antifermentaire du sérum. Les travaux de GESSARD constituent tout ce qui a été dit d'essentiel sur ce sujet.

ANTITYROSINASE

La tyrosinase, diastase oxydante contenue dans un certain nombre de végétaux (suc de betteraves, tubercules de dahlia, son du blé, champignons du genre Lactaire, Russule...) se rencontre également dans quelques organismes animaux : certaines larves d'insectes et crustacés dont les humeurs noircissent à l'air, les Seiches, les Calmars. L'action du sérum a été éprouvée vis-à-vis du ferment végétal et du ferment animal, ferments qui possèdent la propriété bien connue de donner avec une solution de tyrosine une coloration rose qui passe au rouge au bout de quelques instants.

Antityrosinase végétale.—Les réactifs mis en œuvre sont les suivants :

solution diastasique : elle est constituée par une macération glycinée de diverses espèces de Russules et de Lactaires (*Russula delica* et *Lactucarius velutinus*) (250 gr. de champignons réduits en pâte et triturés avec 850 gr. de glycérine). La solution est d'une assez

bonne conservation, surtout si on prend la précaution de la répartir dans des flacons de faible capacité et de petit débit pour éviter l'humidité atmosphérique.

solution de tyrosine à 0,05 %.

Dans ses expériences, GESSARD ⁽⁸⁰⁾ mélange 1 goutte de glycérine diastatique avec un nombre croissant de gouttes de sérum de divers animaux (Cheval, Génisse, Veau, Porc, Mouton, Lapin) et reporte une goutte de chaque mélange dans 2 cc. de solution de tyrosine. Il note l'apparition de la coloration : manifeste dans le tube témoin au bout de 20 minutes, celle-ci n'apparaît en présence des précédents sérums à la dilution de 12 gouttes, qu'au bout de 24 heures. Au taux de 40 gouttes la coloration ne se produit qu'au bout de 9 jours avec le sérum de Veau, 8 avec le sérum de Mouton, 6 celui de Porc, 5 celui de Cheval. C'est le sérum de Lapin qui provoque le retard le plus considérable (11 jours à la dose de 15 gouttes.)

L'action empêchante du sérum déjà des plus nettes à l'état normal a pu être exaltée par le même auteur. L'immunisation pratiquée chez le Lapin fut réalisée, aussi bien à partir de la solution glycérinée précédemment obtenue avec les champignons frais suivant le procédé de Bourquelot et coupée de son volume d'eau, qu'à partir d'une macération aqueuse préparée à partir des champignons séchés dans le vide sulfurique ou à la chaleur d'étuve à 40° et mis en contact 12 h. avec de l'eau chloroformée (15 cc. pour 3 gr. de poudre).

Le sérum des Lapins traités (injections sous-cutanées de 10 cc. espacées de 6 jours en 6 jours) se montre des plus actifs. Alors qu'en présence de 12 gouttes de sérum de Lapin normal la coloration, à quelques exceptions près, apparaît dans les 24 heures, en présence du sérum de Lapin immunisé, et pour des doses respectivement égales à 3, 5 et 7 gouttes, elle se fait attendre 2, 5 et 9 jours.

Ces phénomènes de coloration permettent de mettre en évidence de la façon la plus tangible l'action empêchante du sérum sur le processus diastatique qui peut être ainsi non seulement prévenue (efficacité préventive de GESSARD) mais encore enrayée au cours de son développement (efficacité curative) ⁽⁸¹⁾. L'addition à un moment donné de l'action fermentaire, de quelques gouttes d'immunsérum (6 gouttes) provoque en effet l'arrêt de l'accroissement de cette coloration qui reste alors fixée dans le ton, alors qu'elle continue à pro-

gresser à des degrés divers dans le tube témoin et le tube contenant une même quantité de sérum normal.

Antityrosinase animale. — La préparation de la diastase retirée de la Seiche, animal producteur de mélanine par excellence et dont les tissus de la poche du noir sont particulièrement riches en ferment, est assez délicate; nous ne saurions passer sous silence la technique un peu spéciale à laquelle GESSARD (⁸²) a dû avoir recours.

L'obstruction rapide des pores des bougies filtrantes par les fines particules de noir, le fait qu'au cours de la filtration ce noir extrêmement gênant en lui-même n'est pas sans diminuer le titre diastatique de la solution, ont amené ce savant à dessécher au préalable par exposition dans le vide sulfurique le lambeau de la poche qui circonscrit la glande. Après avoir ainsi provoqué le départ du liquide où les particules pigmentaires sont en suspension, la masse desséchée est divisée aux ciseaux et mise à macérer dans l'eau chloroformée, macération qui ne parvient pas à rompre l'agglutination que montrent alors entre elles dans ces conditions les particules de noir. Le liquide trouble obtenu est ensuite facilement filtré à la bougie.

Ce filtrat, après un titrage préalable, fut injecté par voie sous-cutanée à des Lapins dont les sérums montrèrent une action empêchante qui se traduisit comme avec la tyrosinase végétale par un retard dans le phénomène de coloration. GESSARD constata que ce sérum préparé avec la tyrosinase animale agissait vis-à-vis de la tyrosinase végétale comme un sérum de Lapin normal et que réciproquement le sérum antityrosinasique obtenu à partir du ferment des Russules n'inhibait nullement la diastase des Seiches. Ces conclusions sont à rapprocher de celles de MORGENROTH et de JAVILLIER relatives à l'antiprésure animale et végétale.

ANTILACCASE

C'est la laccase de l'arbre à "laque" *Rhus verniciifera*, produit précipité du latex par l'alcool sous forme de poudre blanche très soluble dans l'eau, qui est intervenue dans les expériences de GESSARD (⁸³). Cette diastase, ainsi qu'on le sait, oxyde certains composés avec une très grande rapidité : de ce nombre sont l'acide गयाconique de la teinture de gayac et le gayacol (sol. à 1 %) qui donnent, le premier

un dérivé d'un beau bleu, le second de la tétragayacoquinone de coloration rouge-grenat : ces réactions colorées, de par leur netteté, ne peuvent être que des plus adéquates à l'étude du pouvoir empêchant du sérum. A l'état normal ce dernier ne provoque qu'une légère atténuation de ces colorations alors que le sérum de Lapins injectés (6 injections de 1 gr. de poudre diastasique espacées de 5 à 6 jours chacune, soit une quantité totale approximative de 0 gr. 15 de laccase vraie) en empêche totalement l'apparition à la dose de 2 gouttes pour 1 goutte de solution de laccase à 2%.

Action antiperoxydasique

Les peroxydases, oxydases indirectes incapables en elles-mêmes de scinder les molécules d'oxygène mais bien des peroxydes comme l'eau oxygénée, sont susceptibles elles aussi de conférer au sérum de l'animal avec elles injecté, ces propriétés empêchantes que nous venons de noter à propos des oxydases. Les expériences de GESSARD avec les peroxydases du malt ⁽⁸⁶⁾ et des Russules ⁽⁸⁴⁾, sont de plus concluantes à cet égard. Le sérum de Lapins préparés par des injections sous-cutanées d'extrait de malt et de macération glycinée de *Russula delica*, empêche en effet à la dose de 2 et 3 gouttes l'apparition de la coloration bleue que produit 1 goutte de liqueur diastasique en présence de 2 cc. d'émulsion de gayac peroxydée. Ajouté après que cette coloration s'est manifestée dans un tube témoin aux mêmes proportions de sérum normal, il en suspend aussitôt de développement.

L'action antiperoxydasique revêt la même spécificité que celle reconnue aux actions antioxydasiques précédemment étudiées, le sérum antiperoxydasique de *Russula delica* étant sans action sur la peroxydase du malt et inversement.

Notons en terminant cet exposé que de la coexistence de plusieurs diastases dans la solution préparante (laccase, tyrosinase, peroxydase dans le cas de la plupart des champignons du genre Russule, amylase et peroxydase pour l'extrait de malt) on peut, ainsi que l'a vérifié GESSARD ⁽⁸⁵⁾, en inférer la polyvalence du sérum antifermentaire qui en dérive. Cette polyvalence n'est que la résultante de la juxtaposition dans la solution préparante des enzymes énumérées.

DEUXIÈME PARTIE

Caractères physico-chimiques et nature biologique de l'action antidiastasique du sérum

(en particulier de l'action antitryptique)

Question complexe entre toutes que celle de la nature physico-chimique et de la nature biologique des antiferments et sur laquelle, malgré les nombreux travaux parus à ce sujet, la lumière est loin d'être encore totalement faite. Nous en ferons une étude aussi complète que possible, avec tout le développement que comporte un chapitre de cette importance.

CHAPITRE I

Caractères physiques et chimiques de l'action antidiastasique du sérum

Ces caractères sont ceux qui, à l'heure actuelle, paraissent les plus parfaitement établis.

Action du temps

Le pouvoir antidiastasique, contrairement à l'opinion de BRIEGER⁽³⁹⁾ et TREBING, semble peu influencé par le temps ainsi que l'a noté MARTIN HAHN. ACHALME, WEINBERG et RUBINSTEIN⁽²⁷⁾ ont

pu conserver en tubes scellés pendant plusieurs mois des sérums actifs. STEVENIN ne constata pas de variations à plusieurs jours d'intervalle, ce que nous-même avons eu maintes fois l'occasion de vérifier tant à propos de l'antitrypsine que des antiprotéases.

Action de la température

Ainsi que l'a constaté YURGENSOHN (1910) les basses températures (+3°) ne modifient pas les propriétés antifermentaires du sérum. Il n'en est pas de même de la chaleur qui influence à des degrés divers les actions précédemment étudiées.

Antiprésure

Les résultats de RÖDEN, BRIOT (³⁵), EFFRONT (⁶³), JAVILLIER sont assez concordants à ce sujet. L'antiprésure supporte la température de 58°. A 60° il y a une altération qui augmente avec la durée du chauffage et s'effectue beaucoup plus rapidement à 62°. Après trois heures au bain-marie à 62° en tubes scellés, l'action empêchante du sérum de Porc sur la présure végétale serait extrêmement faible sinon détruite (JAVILLIER) : en 3 heures à 75° la destruction serait totale. Selon BRIOT ce but serait atteint en 3 heures à 62° en ce qui concerne l'antiprésure animale moins résistante.

Antipepsine

L'action antipeptique s'oppose des plus nettement par son caractère particulier de thermostabilité, aux autres propriétés antifermentaires du sérum qui se montrent en général plus ou moins thermolabiles. Après 30 minutes à 56° on ne constate pas en effet de perte du pouvoir antipeptique : le chauffage semble même le renforcer, fait des plus singuliers sur lequel s'accordent tous les expérimentateurs, BRIOT (³⁵), PERIN (²⁰¹), JOCHMANN et KANTOROWICZ (¹³³), HAMBURGER (¹⁰¹), RUBINSTEIN (²²³⁻²²⁹), P. L. MARIE, LIROSSIER. Les expériences de ces quatre derniers chercheurs qui par des méthodes diverses (détermination de l'intensité de la digestion par dosage de l'azote total, méthode à la gélatine, au carmin-fibrine) sont arrivés à des conclusions du même ordre ne laissent aucun doute à cet égard.

Le pouvoir antipeptique du sérum est donc thermostable et bien plus, la chaleur en renforce l'activité. Cette augmentation, point de départ de controverses nombreuses, a été, ainsi que nous le verrons dans la suite, diversement interprétée par les auteurs qui ont tenté d'en donner l'explication.

Antitrypsine

L'inactivation par la chaleur contestée seulement par DÖBLIN ⁽³⁰⁾ et BAUER ⁽¹²⁾ est admise à l'heure actuelle par la généralité des auteurs dont les observations en ce qui concerne les températures de destruction sont seules quelque peu discordantes.

Pour ACHALME (1901) le chauffage à 55-56° pendant une heure affaiblirait considérablement (50 % environ) le pouvoir antitryptique du sérum (Cobayes neufs ou immunisés), données confirmées dans la suite par DELEZENNE ⁽⁵⁵⁾, CATHCART ⁽⁴⁷⁾, STERN et EPPENSTEIN ⁽²⁵⁰⁾, KURT MEYER ⁽¹⁷⁷⁾, PURGESZ ⁽²¹⁰⁾. Cet affaiblissement différencierait ainsi l'antitrypsine des sensibilisatrices hémolytiques ou bactériolytiques stables à cette température.

La disparition du pouvoir empêchant ne serait manifeste qu'après un chauffage de 30 minutes à 60° (JOCHMANN et KANTOROWICZ, BERGMANN et MEYER, JOBLING ⁽¹¹⁰⁾, CAMUS et GLEY ⁽⁴¹⁾ ou même entre 65°-70° (ACHALME, DELEZENNE, ZUNZ ⁽²⁰¹⁾, COBLINER, KAMMERER, RONDONI). Pour ACHALME la destruction complète ne serait atteinte qu'à 100° en 15 minutes, la substance empêchante n'étant à 67° que simplement immobilisée sur le précipité albumineux dont elle ferait partie intégrante.

WEINBERG et RUBINSTEIN ⁽²⁷⁷⁾ signalent la sensibilité variable à la température de 56° de l'antitrypsine du sérum humain qui ne saurait être détruite dans tous les cas qu'après un séjour de 3 heures au bain-marie, à cette température. Pour FUJIMOTO ⁽⁷⁴⁾ (1918) qui indique pour ce même sérum 65°-66° pendant 30 minutes, les températures d'inactivation ne varient pas individuellement mais pas rapport aux espèces, entre 65 et 75° ; elles se répartiraient ainsi (sérum dilué à 1 %, pour éviter la coagulation).

Sérum Lapin, destruction à 75°, en 10 minutes.

Sérum Mouton, destruction à 75°, en 10 minutes.

Sérum Cheval, destruction à 65°, en 10 minutes

Sérum humain, destruction à 65-66°, en 30 minutes.

La température mortelle serait plus élevée par ailleurs pour le sérum de Bœuf que pour le sérum humain.

Nous avons noté que le pouvoir antitryptique du sérum de Cobaye (dilution au 1/10^e dans l'eau distillée ou l'eau physiologique) n'était pas affaibli par un chauffage de 30 minutes à 55° : à 75° et après le même laps de temps la destruction est complète.

Pour TEALE et BACH le sérum de Lapin sensiblement affaibli après 45 minutes à 60° ne serait complètement inactivé qu'après 3 ou 4 h. à la même température.

Signalons en passant la plus grande résistance du pouvoir antitryptique de l'urine dont l'inactivation ne pourrait être réalisée que par chauffage d'une demi-heure à 100°.

Antiprotéases.

D'après EFFRONT, elles supporteraient la température de 75° pendant 30 minutes sans s'affaiblir sensiblement, ce qui permettrait ainsi de les séparer de l'antitrypsine qui ne résiste pas à cette température. A 85° on noterait un commencement d'altération, à 100° la destruction serait complète.

Des données manquent encore à ce point de vue sur les autres actions antifermentaires du sérum. GESSARD (1910) signale seulement que le chauffage à 60° pendant 30 minutes laisse intacte l'antityrosinase normale ou d'immunisation.

Les considérations qui suivent se rapportent pour la plupart à l'étude du pouvoir antitryptique du sérum sur lequel s'est portée presque exclusivement, pour des raisons précédemment développées, l'attention des expérimentateurs.

Action des rayons ultra-violets. — Agitation

WEINBERG et RUBINSTEIN (²⁷⁶) ont noté l'action destructive des rayons ultra-violets sur l'antitrypsine et l'antipepsine du sérum. Cette destruction, plus rapidement obtenue avec cette dernière, serait en rapport direct avec le temps pendant lequel le sérum demeure exposé à l'action des rayons et la durée du contact serait fonction de la valeur de l'indice antitryptique.

Les essais d'inactivation par agitation tentés par FUJIMOTO sur des sérums de Lapin et de Cheval agités 2 à 3 heures à 37 et 49°, sont demeurés négatifs ; ces résultats s'opposent au fait bien connu de l'inactivation du complément par agitation 30 minutes à 37°.

Action de la dialyse

Les auteurs, à l'exception de E. ROSENTHAL (²²²) (1910), s'accordent à reconnaître que les substances antifermentaires du sérum ne sont pas dialysables. C'est l'opinion de MARTIN JACOBY, ISCOVESCO (¹¹⁵), VON BERGMANN, ZUNZ (²⁹²) dont les expériences de dialyse en sac de collodion sur du sérum de Chien maintenu 1, 3 et 5 jours à la glacière sont des plus nettes à cet égard. L'affaiblissement, relativement tardif d'ailleurs, noté par cet auteur, du pouvoir antidiastatique du sérum ainsi dialysé ne saurait être en effet rapporté, ainsi que nous le verrons dans la suite, qu'à une absorption par la membrane dialysante des substances empêchantes. Les précédentes conclusions n'ont pas été démenties depuis par RONDONI (²²¹), KURT MEYER (¹⁷⁷), WEINBERG et RUBINSTEIN (²⁷⁷). FUJIMOTO affirme que le pouvoir antitryptique du sérum n'est pas diminué après dialyse de 1 à 4 jours : celui de l'urine disparaîtrait par contre après une dialyse de 48 heures.

Influence du contact avec le noir animal, le collodion

Le noir animal, le collodion, exercent sur les substances antidiastatiques du sérum une action adsorbante analogue à celle qui leur est reconnue à l'égard des ferments par MICHAELIS et EHRENREICH, ZUNZ, BIERRY et SCHAEFFER, STRADA...

ZUNZ (²⁹²) a constaté que le pouvoir empêchant du sérum de Chien dilué à 10 %, laissé 24 heures en contact à la température de 20° avec du noir animal, est nettement diminué : dans le cas du sérum chauffé préalablement 50 minutes à 65-70°, cette influence est bien moins sensible sur des propriétés inhibitrices déjà fortement affaiblies.

La même adsorption partielle a été notée par cet auteur de la part du collodion qui constitue le sac de dialyse dans les expériences précédemment mentionnées : après dialyse de 5 jours du sérum, le sac

lavé à l'eau physiologique, séché et réduit en poudre, fut mis en contact pendant 3 heures à 20° avec la solution fermentaire, de façon à lui permettre de reprendre au collodion les substances empêchantes éventuellement adsorbées. Après filtration, le pouvoir fermentaire du filtrat fut déterminé par la méthode de FULD et sa valeur comparée à celle obtenue dans une réaction contrôle, dont, pour les raisons signalées plus haut, la nécessité est ici des plus manifestes (réaction témoin avec sac de collodion neuf traité dans les mêmes conditions). Cette adsorption des substances empêchantes serait par ailleurs, toujours d'après ZUNZ, corrélative d'une élévation de la tension superficielle de sérum.

Action des acides, des bases...

Les observations premières de HEDIN (¹⁰⁷), KUDO (¹⁴⁴), RONDONI, ont été vérifiées par les expériences de TEALE et BACH (²⁵²) qui indiquent que pour une concentration N/20 d'acide lactique ou de soude le pouvoir antitryptique est détruit. Cette destruction serait obtenue en 35 minutes avec l'acide lactique N/20 et la neutralisation ne restituerait pas au sérum, dans les deux cas, ses propriétés antifermentaires. L'alcool détruit en la précipitant la substance empêchante, constatation faite en 1897 par RÖDEN. Le chloroforme, l'éther, l'iode, l'iodure de potassium, l'eau oxygénée exercent la même action nocive (DELEZENNE et POZERSKI (⁵⁶), JOBLING (¹¹⁹) TEALE et BACH (²⁵²). Ces derniers auteurs signalent, et il n'est pas sans intérêt de la rappeler ici, que le faible ferment protéolytique existant dans le sérum est des plus sensibles à l'influence des précédents agents destructeurs de l'antitrypsine. Sa sensibilité à la chaleur (56°) et à de faibles variations de la réaction (N/400) en rendrait la mise en évidence difficile ; seul, le traitement du sérum desséché par le chloroforme à 37°, ne modifierait pas son activité.

CHAPITRE II

Rapport des propriétés antifermentaires avec les constituants du sérum.

Nature de l'action empêchante.

Le problème de la nature chimique des substances, qui dans le sérum supportent les propriétés antifermentaires et en particulier la propriété antitryptique de ce liquide, n'est certes pas encore parfaitement élucidé. La divergence des opinions émises par les divers chercheurs témoigne de l'extrême complexité de ce sujet. L'exposé de théories auxquelles se sont ralliés les expérimentateurs, leur discussion à la lumière de faits nouveaux et d'expériences conduites avec rigueur, permettra cependant, sinon de prendre position d'une façon tout à fait définitive, tout au moins d'orienter le débat et de le limiter.

I. Influence de la réaction, des sels du sérum, des produits de dédoublement des protéines. — La réaction, pas plus que la présence de sels, ne semble jouer un rôle dans l'action exercée par le sérum sur les diastases. CAMUS et GLEY (¹⁰) ont montré en particulier, que le pouvoir antipeptique était indépendant de l'alcalinité du sérum. D'autre part, le fait que le pouvoir antifermentaire n'est pas touché par la dialyse en sac de collodion atteste que les sels, pas plus que les produits de clivage des protéines, auxquels BAYLISS (¹³) (1904), ABDERHALDEN et GIGON (¹) (1907), ROSENTHAL (²²²) (1910), WALTERS (²³⁵) (1917) prétendent accorder un rôle dans ces phénomènes d'inhibition, ne sont capables par eux-mêmes de neutraliser l'action de la trypsine. Ils n'ont par ailleurs aucune action antitryptique, s'ils

sont employés aux mêmes dilutions que celles où ils se trouvent dans le plasma (WEINBERG, RUBINSTEIN).

L'influence de ces facteurs étant ainsi mise hors de cause, il va nous être donné de procéder à l'étude de deux éléments du sérum dont le rôle, étant donné leur importance, a été plus longuement discuté.

II. Action des lipoides du sérum. — Théories de Schwarz et de Jobling. — Les substances qui supportent les propriétés inhibitrices du sérum, seraient constituées, pour un groupe d'auteurs, par des combinaisons de nature lipoidique. Cette théorie soutenue par SCHWARZ (^{244.245}) (1909) et partagée par un certain nombre d'expérimentateurs : WEINLAND (²⁷⁸) (1902), DELEZENNE et POZERSKI (⁶⁷) (1903), NEUMANN (¹⁹⁴) (1908), PICK et PRIBRAM (²⁰⁴), KAWASHIMA (¹³⁹) (1909), BAUER (¹²) (1910), a été reprise et développée par JOBLING et ses collaborateurs (¹¹⁹) (1914).

SCHWARZ prétend qu'un sérum inactivé par l'éther, le benzol, l'huile d'olives, retrouve son pouvoir empêchant par l'addition de lipoides (solution de lécithine, alcools-savons), dont une émulsion à 5 % dans une solution chlorurée sodique, ne serait pas sans exercer un affaiblissement notable sur l'activité de la pancréatine du Cheval ou du Chien. Il aurait constaté par ailleurs, au cours d'expériences sur des Lapins injectés sous la peau d'extrait de corps thyroïde et d'huile phosphorée, une augmentation du pouvoir antifermentaire qui irait de paire avec un accroissement des substances lipoidiques. De ces faits, il se croit autorisé à conclure que le substratum des propriétés antitryptiques du sérum est constitué par des lipoides, sous forme de combinaison lipoido-albumine.

JOBLING et son école confirment les vues de SCHWARZ et attestent de la concordance de leurs résultats en ce qui concerne les sérums d'Homme, de Cheval, de Chien et de Cobaye. Ces sérums (dilution au 1/5), traités par deux fois leur volume de chloroforme ou d'éther, accuseraient après 48 heures de contact avec ces solvants (agitation fréquente) une perte sensible de leur pouvoir inhibiteur (60 % environ). Cette diminution notable de l'activité antifermentaire du sérum ne saurait trouver, selon les auteurs, sa raison dans la destruction des substances antitryptiques, mais bien dans un déplacement par les solvants mis en œuvre. Le fait, que par suite d'une saponification

complète, les extraits étherés ou chloroformiques manifestent une action inhibitrice des plus nettes sur l'activité tryptique, affirmerait, d'après eux, cette manière de voir.

Ces mêmes auteurs, en signalant que le pouvoir antitryptique de ces savons est proportionnel au degré de non saturation de leurs acides gras, auraient noté par ailleurs une augmentation marquée du pouvoir antitryptique à la suite d'injections chez le Cobaye de lipoïdes extraits du jaune d'œuf ou des sérums d'Homme et de Cobaye.

Ainsi on serait conduit à admettre que les substances antitryptiques du sérum sont constituées par des acides gras non saturés en combinaisons lipoïdiques. Pour JOBLING (¹²⁰) la haute toxicité manifeste des sérums ainsi privés de leurs acides gras serait un fait capital qui amplifierait singulièrement le rôle joué dans l'organisme par les antiferments.

Cette théorie, assez séduisante en elle-même, et qui permettrait par ailleurs de rapprocher, du point de vue de leur action, l'antitrypsine, des antitoxines et des antihémolysines, a été sérieusement battue en brèche. Les assertions de SCHWARZ et JOBLING ont été contestées par de nombreux savants. LAUNOY (1909), COBLINER, RONDONI (1910), K. MEYER (1911), WEINBERG et RUBINSTEIN (1912) se refusent à admettre leurs conclusions, étant donnés les résultats négatifs obtenus sur divers sérums traités par l'éther, le chloroforme... KURT MEYER (¹⁷⁶) ne note par ailleurs aucune modification du pouvoir antifermentaire du sérum à la suite d'injections intraveineuses de lipoïdes et il signale avec COBLINER (⁵²) ce fait que les sérums de syphilitiques riches en lipoïdes n'accusent pas un indice élevé. De même les sérums d'Anguille et de Poule, dont la teneur en lipoïdes et assez marquée, se montrent faiblement antitryptiques (LAUNOY). Il est à rappeler aussi que les alcaloïdes narcotiques qui provoquent chez les animaux une augmentation des composés lipoïdiques sont sans influence sur le pouvoir empêchant du sérum, et que par ailleurs il est bien établi que l'ovo-lécithine ne se montre par elle-même nullement antitryptique (Mlle KALABOUKOFF et TERROINE (¹³⁴), STEVENIN, TEALE et BACH (²⁵²)).

Dernièrement enfin, les expériences de FUJIMOTO (1918) et surtout de TEALE et BACH (1920) auxquels nous devons une mention toute particulière sont venus condamner, sans aucun recours à notre avis

les résultats de JOBLING. Il est incontestable que les solvants des lipoïdes (éther, chloroforme) privent le sérum de ses propriétés antitryptiques, mais c'est en provoquant leur destruction, et cette perte, il convient de le noter, n'est pas proportionnelle à la quantité de lipoïdes extraits : elle est la même, que l'extraction ait lieu à 37° ou à la température du laboratoire. On ne saurait de plus oublier, et ceci n'est point sans importance, que cette extraction à laquelle on procède ne va pas sans une altération profonde des protéines en partie précipitées et coagulées par ce traitement. Ce grave écueil qui ne saurait que partiellement expliquer certaines des conclusions pour le moins trop hâtives de JOBLING, peut être évité en desséchant préalablement le sérum dans le vide sulfurique, opération qui n'est pas susceptible par ailleurs de modifier sa solubilité. Dans ces conditions (sérum desséché) les solvants des lipoïdes sont sans action sur le pouvoir antitryptique du sérum. TEALE et BACH l'ont vérifié sur les sérums de Cobaye et de Lapin desséchés dans le vide et, après pulvérisation, épuisés par le chloroforme, l'éther, l'éther de pétrole, le xylol (contact 3 heures à 37°). La détermination du pouvoir antitryptique était effectuée sur le résidu de la filtration des solvants, résidu total (y compris le filtre) desséché dans le vide et repris par l'eau physiologique.

Les résultats sont du même ordre après un traitement par l'alcool absolu (24 heures) suivi d'une extraction chloroformique (4 ou 6 h.) opérations qui ont pour résultat d'entraîner non seulement les lipoïdes non combinés mais aussi de déplacer les lipoïdes combinés. Sous quelque forme qu'ils soient, les lipoïdes ne sauraient donc conditionner le pouvoir antitryptique du sérum. Signalons en passant que, contrairement encore à l'opinion de JOBLING, la quantité de graisses déplacées par l'extraction chloroformique est plus élevée à partir du sérum desséché que de sérum frais.

Quant à l'action empêchante des savons obtenus à partir de ces extraits lipoïdiques, action dont argue JOBLING pour étayer sa théorie elle n'est pas contestée par les expérimentateurs anglais qui ne manquent pas par contre de souligner les différences qui la séparent de l'activité antifermentaire du sérum. S'il est bien exact que tous les savons détruisent la trypsine, et ceci, en opposition encore avec JOBLING, quel que soit le degré de non saturation de leurs acides gras (savons à base d'acides stéarique, oléique, huiles de croton et de lin),

il n'est pas douteux non plus que leur action est complètement différente de celle d'une véritable antitrypsine. Alors que le fait de laisser quelque temps en contact (30 minutes à 37°) le sérum et la trypsine avant l'addition de gélatine, conduit à des résultats sensiblement du même ordre que ceux obtenus quand la gélatine est ajoutée simultanément, il y a une très grande différence dans le degré d'inhibition exercée par les savons selon que l'opération est effectuée en deux temps ou en un seul. En outre la concentration dans le cas des savons, traduit ses effets d'une façon beaucoup plus manifeste qu'avec le sérum et ceux-ci agissent sur la trypsine qu'ils détruisent en vertu de leur concentration en ions H.

Le pouvoir antitryptique ne saurait donc, de toutes façons être rapporté aux lipoïdes du sérum et la théorie de SCHWARZ et JOBLING ainsi sapée à la base, ne mérite plus qu'un simple intérêt historique.

III. Action des protéines du sérum. — Nature protéique de la substance empêchante.— Il est plus vraisemblable, et c'est l'opinion à laquelle nous nous rallions, que le support des propriétés antidiastases du sérum est de nature protéique. Mais là encore les opinions sont partagées, certains auteurs ne voulant rattacher ces propriétés qu'à telle ou telle fraction albuminoïde du sérum.

Pour FULD et SPIRO (⁷⁶) (1900) (action antilabique), GLAESSNER (⁹¹) (1903) (action antitryptique), l'action antifermentaire est liée aux globulines, fraction précipitable par le sulfate d'ammoniaque à saturation au 1/3 (euglobuline de GLAESSNER) ou au 1/2 (euglobuline et pseudo-globuline de FULD et SPIRO).

LANDSTEINER (¹⁴⁶), CATHCART (⁴⁷), VERNON (²⁶⁰), HEDIN (¹⁰⁵), BAER (¹⁰), OPIE et BARKER (¹⁹⁸), MÜLLER (¹⁹⁰), RONDONI (²²⁰), prétendent au contraire que le pouvoir inhibiteur est dû à la sérum-albumine.

Pour un autre groupe de chercheurs enfin, les deux fractions albumine et globuline exerceraient à des degrés divers une action empêchante. D'après OPPENHEIMER et ARON (²⁰⁰), WEINBERG et RUBINSSTEIN (²⁷⁷) le rôle joué par ces protéines serait sensiblement égal. TEALE et BACH (²⁵²) accordent aux fractions pseudo-globuline et albumine un pouvoir antitryptique qu'ils ne reconnaissent pas par contre à l'euglobuline.

DÖBLIN (⁵⁹), KAWASHIMA, K. MEYER (¹⁷⁶), inclinent à croire, opinion partagée aussi par KAMMERER, AUBRY (¹³⁶) et dernièrement vérifiée par FUJIMOTO, que cette propriété est plus adhérente aux albumines qu'aux globulines, quelle que soit la méthode de fractionnement à laquelle on ait recours (sulfate d'ammoniaque à demi-saturation, CO², méthode de SACHS avec HCl N/250. Quant à l'augmentation du pouvoir antitryptique des globulines du sérum chauffé, signalée par KAMMERER et AUBRY, elle s'expliquerait par leur plus grande résistance, par rapport aux albumines, à l'action de la chaleur.

Ainsi les protéines, et nous n'en voulons encore pour preuve que les expériences de FUJIMOTO avec l'albumine cristallisée obtenue à l'état de pureté à partir de sérum de Cheval, exercent une action antitryptique indéniable. N'existe-t-il pas dans le sérum d'autres substances empêchantes ? On serait en droit de se le demander si l'on considère que l'action anti n'est nullement en rapport avec la concentration du sérum en ces substances protéiques. L'immunisation à la trypsine pancréatique ne paraît déterminer aucun changement dans la teneur du sérum en protéines, ce qui confirme surtout, il convient de l'avouer, que l'établissement de l'immunité n'est pas lié à une concentration plus grande en protéines. Le fait que le quotient protéique demeure le même au cours de troubles du métabolisme, de périodes de digestion intense et de jeûne prolongé (HANSON) (¹⁰³), alors que le pouvoir antitryptique accuse en même temps quelques variations, parlerait plutôt en faveur de cette hypothèse. Ces variations ne seraient-elles pas plutôt tout simplement le fait de modifications dans la nature même de ces protéines ? Les considérations qui suivent ne manqueront pas d'apporter quelques éclaircissements sur ce sujet.

CHAPITRE III

Mécanisme de l'action empêchante

Assez diversement interprété par les auteurs, le mécanisme de cette action peut, dans son ensemble, être rapporté à deux théories qui, à les considérer d'un peu près, ne sont pas totalement opposées en elles-mêmes. Il s'agirait pour les uns d'un simple phénomène physico-chimique, d'une adhésion entre colloïdes ; pour les autres, d'une liaison spécifique entre ferments et antiferments, entre antigènes et anticorps.

Théorie physico-chimique. — Selon HEDIN (¹⁰⁵⁻¹⁰⁸), il y aurait adsorption de la trypsine par l'albumine du sérum, fixation qui serait irréversible ou tout au moins très difficilement réversible. BRIOT (³⁸) est sensiblement du même avis en ce qui concerne l'action antipré-surante. La similitude que l'on observe entre le pouvoir empêchant exercé par le noir animal et le sérum, l'influence manifeste dans ces deux cas de l'ordre dans lequel le mélange des divers éléments de la réaction est effectué, attesteraient, d'après HEDIN, cette manière de voir. GENGOU (1908) se rallie à cette idée : il s'agirait pour lui de la "substitution d'un phénomène d'adhésion à un autre, de la formation d'un complexe en lieu et place d'un autre". Les phénomènes d'adhésion moléculaire joueraient ainsi un rôle important dans ces réactions, opinion partagée par VICTOR HENRI, ISCOVESCO et ANDRE MAYER (1906) dont les expériences nombreuses sur les colloïdes électropositifs et électronégatifs et leurs complexes confirment ces vues. ISCOVESCO (¹¹⁶) attribue l'action empêchante du sérum sur la pepsine par lui étudiée, à la formation d'un complexe colloïdal insoluble qui se précipite : ce serait la sérum-globuline négative qui réagirait sur le colloïde électropositif constitué par le

ferment envisagé. L'action empêchante ne serait que la traduction des phénomènes d'adsorption exercés par les granules ultra-microscopiques des ferments sur les colloïdes du sérum, la coagulation ou l'agglutination, aboutissants habituels de ces phénomènes, ne se produisant que dans l'inter-réaction de colloïdes de signe contraire.

Cette théorie fort intéressante rend compte d'un certain nombre de faits difficilement explicables par la seule hypothèse de l'antiferment spécifique. La grosse objection de principe qu'on ne manque pas de faire à cette dernière hypothèse est l'action empêchante des plus nettes exercée par certaines substances albuminoïdes en solution, qui n'ont rien à voir avec les antiferments. L'ovalbumine crue à dose faible entrave la digestion tryptique de l'albumine coagulée, de la caséine, de la gélatine, et son action semble en tous points (non dialysabilité, thermolabilité..) analogue à celle exercée par le sérum (DELEZENNE et POZERSKI ⁽⁵⁸⁾), VERNON, TEALE et BACH). P. L. MARIE ⁽¹⁶⁹⁾ a pu observer la même action empêchante de l'ovalbumine sur la digestion peptique, aussi bien avec le sérum qu'avec le blanc d'œuf coagulés comme tests.

La nature colloïdale des substances antifermentaires du sérum s'accorde parfaitement par ailleurs avec l'atténuation de leurs propriétés sous l'influence de la chaleur. Les modifications apportées par le chauffage dans l'état des colloïdes du sérum (moindre stabilité des granules colloïdaux, augmentation du volume des micelles, leur accolement entre elles) ne sont pas sans modifier l'intensité des réactions ultérieures. Il est un fait pourtant autour duquel on a beaucoup discuté, étant donnée son opposition complète avec ce que l'on observe généralement. Alors que le pouvoir empêchant du sérum sur les diastases précédemment étudiées est détruit par la chaleur, le chauffage du sérum non seulement ne modifie point son action sur la digestion peptique, mais paraît au contraire, ainsi que nous l'avons vu, très nettement la renforcer. Assez singulière en elle même cette résistance à la chaleur ne saurait être rapportée à une autre cause que celle donnée par PERIN ⁽²⁰¹⁾. Cet auteur, en dosant l'acidité libre et combinée dans le sérum chauffé, a constaté que ce dernier fixe plus d'acide que le sérum frais. Cette interprétation à laquelle se rallie aussi RUBINSTEIN ⁽²²⁹⁾, paraît assez acceptable et la thermostabilité du pouvoir antipeptique cesserait de ce fait d'être un argument

contre l'hypothèse de l'action antifermentaire considérée comme liée à la présence d'anticorps spécifiques.

11. Les antiferments considérés comme anticorps. — Un grand nombre d'expérimentateurs considèrent les substances antifermentaires du sérum comme de véritables anticorps, et veulent rapprocher la neutralisation d'une trypsine par un sérum, de la neutralisation d'une toxine par une antitoxine. MARTIN JACOBY (1906) a tenté le premier de rattacher les faits connus sur les actions antidiastasiques à la théorie des chaînes latérales soutenue par EHRLICH et ses élèves. Les relations étroites qui semblent exister entre les diastases et les toxines, la possibilité surtout de provoquer par l'immunisation l'apparition de propriétés antifermentaires comme on crée les anticorps des toxines, les modifications que ces propriétés subissent du fait du chauffage ont fortifié ce rapprochement. La spécificité des divers antiferments, l'absence de parallélisme notée au cours de cette étude entre les actions antitryptique, antipeptique, antiprésurante d'un même sérum, constituent encore de sérieux arguments à l'appui de cette hypothèse partagée par la plupart des auteurs allemands K. MEYER, GLAESSNER, MORGENROTH, BAMBERG, JOCHMANN et KANTOROWICZ, POGGENPOHL (²⁰⁵), EISNER... et en France par JAVILLIER, MESNIL (¹⁷²), STEVENIN, WEINBERG et RUBINSTEIN...

Cette théorie rend parfaitement compte de l'action empêchante des sérums préparés, ainsi que de celle qu'ils manifestent à l'état normal vis-à-vis des seuls ferments de l'organisme. Dans ce dernier cas, cette action ne serait que la traduction d'une immunisation progressive de l'organisme contre des éléments faisant normalement partie de sa constitution (⁴⁸⁻⁴⁹). Ce que nous savons sur les autolysines dans l'hémoglobininurie paroxystique, DONATH et LANDSTEINER (^{151 bis}), EMMERICH et MEYER (^{64 bis}), est à rapprocher des résultats antérieurs de UHLENHUTH, ADLER (⁴) qui ont pu produire chez le Cobaye des anticorps contre son propre cristallin et ses propres spermatozoïdes, et vient confirmer cette opinion qu'une substance de l'organisme lui-même peut servir d'antigène.

Mais où la thèse des antiferments paraît être en défaut c'est quand il s'agit d'expliquer l'action empêchante que le sérum normal exerce vis-à-vis des diastases étrangères (protéases microbiennes, tyrosinase...). Notons cependant que le degré d'inhibition est le plus généralement faible, et nullement comparable à celui réalisé à l'égard de diastases

faible, et nullement comparable à celui réalisé à l'égard de diastases comme la trypsine, la pepsine. La théorie colloïdale vient alors nous donner la raison de ces phénomènes et nous pensons par ailleurs que, loin de s'opposer à la théorie des antiferments, elle est parfaitement susceptible de se concilier avec elle. Il paraissait à première vue difficile d'identifier l'antiferment d'immunisation avec le pouvoir inhibiteur normal du sérum et voici que ces deux actions trouvent leur raison d'être dans une compréhension plus large de la théorie colloïdale. Les corps qui agissent dans les phénomènes d'immunité étant des colloïdes, les actions antifermentaires d'immunité, tout comme les actions antifermentaires normales, ne seraient ainsi dues qu'à des réactions entre colloïdes : d'un côté les protéines du sérum, de l'autre les diastases que V. HENRI a si parfaitement dénommées "catalyseurs colloïdaux spécifiques". Parmi les lois auxquelles obéissent de ce fait ces réactions, la plus importante serait la loi d'adsorption dont nous avons précédemment fait mention. Telle est à notre avis la conception que l'on peut se faire de la nature et du mécanisme de l'action antidiastasique du sérum dont ce serait là une propriété normale, une sorte de constante d'équilibre dont nous ne connaissons encore que bien imparfaitement tout le rôle.

TROISIÈME PARTIE

Étude des modifications du pouvoir antifermentaire du sérum sanguin et des causes de ces variations

CHAPITRE I

Variations physiologiques

Age.—BRIOT⁽³⁵⁾ et JAVILLIER s'accordent à reconnaître que le sérum des jeunes animaux (Lapins) est plus antiprésurant que celui des adultes. En ce qui concerne l'antitrypsine, les résultats sont contradictoires. ACHALME et FINZI⁽⁷³⁾ auraient constaté la moindre activité antitryptique du sérum des jeunes animaux et REUSS⁽²¹⁴⁾ (1909) noté chez des nourrissons des valeurs au-dessous de la normale. BECKER⁽¹⁶⁾ (1909) n'aurait par contre pas relevé de différence entre l'enfant et l'adulte. LUST⁽¹⁶⁶⁾ (1909) et STEVENIN (1911) partagent entièrement cette manière de voir à laquelle s'opposent les conclusions plus récentes de REYMAN⁽²¹⁵⁾ (1920). Ce dernier auteur aurait trouvé chez la Chèvre des valeurs plus élevées pour les petits que pour les mères : il semblerait exister de plus, d'après lui, un certain rapport entre la croissance et le pouvoir antitryptique du sang qui accuserait une diminution quand l'enfant se développe mal.

Selon FINZI le sérum des animaux âgés se montrerait d'une façon générale fortement antitryptique.

Grossesse. — Accouchement. — HALBAN et LANDSTEINER (¹⁰⁰) (1902) ont les premiers noté une augmentation de la teneur en antiferment chez les femelles gravides, observation confirmée par GRAEFENBERG (⁹⁵), ROSENTHAL (²²²), THALER (²⁵³) (1909), GAMMELTOFT (⁷⁹) (1912) ce dernier en ce qui concerne tout au moins la gestation chez la femme, aucune augmentation n'ayant été relevée chez le Lapin et le Cobaye. Cette manière de voir n'est pas partagée par BECKER (¹⁷) et STEVENIN qui ne signalent aucun changement dans des sérums pris à différentes périodes de la puerpéralité. Par contre, tous ces expérimentateurs sont d'accord et REYMAN avec eux, pour admettre qu'il y a une augmentation notable de l'antitrypsine au moment de l'accouchement, augmentation qui se poursuivrait même dans la plupart des cas un certain temps après la naissance (REYMAN). Pour GRAEFENBERG le retour à la normale s'effectuerait assez rapidement (vers le 8^e ou 10^e jour); pour les autres, seulement au bout de 3 semaines.

Digestion. — Alimentation. — En concordance avec les observations de GLAESSNER (⁹¹), ZUNZ (²⁹¹) a vu le pouvoir antiprotéolytique du sérum de Chien (sérum recueilli une heure 1/2, 3 h., 5 h. et 7 h. après le repas) s'accroître dans la majorité des cas après un abondant repas de viande crue de Cheval, à un degré moindre cependant que ne l'avait noté son prédécesseur.

REMEDY et BOLOGNESI (³¹²) se prononcent nettement en faveur d'une augmentation (expériences sur le Lapin): cette manière de voir n'est contestée de façon absolue que par MARCUS (¹⁶⁸) qui aurait tout au contraire observé chez l'Homme une diminution après le repas. Les observations de STEVENIN, TEALE et BACH (²⁵²), qui n'ont pas relevé chez l'Homme et le Lapin de modifications appréciables, sont plutôt à rapprocher des constatations de POGGENPOHL (²⁰⁷) COBLINER, JOBLING, PETERSEN et EGGSTEIN (¹²⁴). L'augmentation signalée par ces auteurs, tant chez l'enfant que chez le Chien adulte, est en effet souvent plus ou moins nette: elle est d'autre part, loin d'être de règle, autant de faits qui peuvent nous autoriser à conclure

à l'absence de variations en rapport avec la digestion ou l'alimentation.

Jeûne. — Inanition. — Il ne semble pas que l'on doive adopter des conclusions tout à fait du même ordre en ce qui concerne le jeûne. FURST le premier (⁷⁷) (1909) a étudié les variations qu'il est susceptible de déterminer et a constaté une élévation du pouvoir antitryptique chez des Cobayes au cours de jeûnes d'une semaine, élévation progressive en rapport avec la perte de poids. Ces données n'ont pas été vérifiées dans la suite par COBLINER (1910) qui ne note pas de changement chez des Lapins et des Chiens après 5 à 6 jours de jeûne. Pour JOBLING et PETERSEN (¹²⁵) (1914) il se produirait une diminution de l'antitrypsine du sérum (Lapin, Chien), diminution corrélative d'une augmentation de l'azote non coagulable, indice d'une intoxication protéique. La mort par le jeûne serait due, d'après ces auteurs, à une intoxication par les produits de désintégration protéique, et les variations des albuminoïdes paraîtraient au cours de la période de jeûne conditionnées d'une manière très nette par l'état du pouvoir antitryptique : si celui-ci est élevé l'azote serait excrétée en petite quantité ; avec un pouvoir antitryptique faible au contraire on constaterait une excrétion azotée relativement considérable. Alors qu'au cours de cette intoxication, la dilution du sérum n'empêche pas une issue fatale, l'augmentation expérimentale, artificielle, du titre antitryptique prolongerait la survie.

SAMUEL HANSON (1918) n'a pu confirmer ces faits et il a montré que le quotient protéique n'était nullement influencé par un trouble du métabolisme de l'ordre de celui produit chez les Lapins par des périodes de jeûne prolongé alternant par ailleurs avec des périodes de digestion. Le rapport globuline-albumine, déterminé par la méthode réfractométrique, n'accuserait pas de variations sensibles.

Il en serait de même d'après TEALE et BACH (²⁵³) du pouvoir antitryptique qui serait plutôt légèrement diminué. Ceci corrobore ce que nous avons pu noter chez des Cobayes ayant jeûné 40 et 60 heures et accusant une perte de poids de 60 gr. environ. La détermination des optima (optimum approché : 0,08-0,09, optimum réel : 0,1) ainsi que l'allure générale des graphiques, parlent plutôt nettement en faveur d'une diminution.

CHAPITRE II

Variations du pouvoir antidiastatique du sérum au cours de processus pathologiques.

Causes de ces variations

L'étude des variations du pouvoir antifermentaire au cours des processus pathologiques, étant donnée l'importance théorique et pratique des conclusions auxquelles elle conduit, ne pouvait manquer de retenir longtemps l'attention des chercheurs. Leurs observations ont surtout porté sur les modifications provoquées dans le pouvoir antitryptique. La recherche du pouvoir antipeptique qui ne semble pas montrer le même intérêt, au point de vue clinique particulièrement, n'a fait l'objet que d'un très petit nombre de travaux.

Pouvoir antipeptique

Son étude, ainsi qu'il résulte des observations de divers auteurs, ne paraît pas devoir donner d'utiles indications diagnostiques. OGURO (¹⁹⁶) n'a pas noté en effet de modifications dans les quelques cas par lui étudiés (urémie, méningite, cancer, épilepsie). RUBINSTEIN et GIRAULT (²³⁰) n'ont trouvé aussi que très rarement des variations de l'indice antipeptique dans le cancer, l'ulcère de l'estomac. Ces variations sont par ailleurs des plus irrégulières et indépendantes du chimisme stomacal, du sujet et de la nature des lésions, de leurs complications, de l'âge de la maladie.

P.-L. MARIE (¹⁶⁹) affirme cette manière de voir et conclut que le pouvoir antipeptique du sérum, nullement influencé par le jeûne ou par la digestion, "n'est pas en rapport avec l'activité peptique du suc gastrique ou avec son acidité, pas plus qu'avec l'existence ou l'absence d'un ulcère gastrique".

La valeur de cette recherche au cours des gastropathies semble donc entièrement négative.

Pouvoir antitryptique.

I. — Pathologie humaine

Nous aurons à nous étendre beaucoup plus longuement sur le pouvoir antitryptique dont les modifications ont été recherchées au cours des affections les plus diverses. Dans l'impossibilité, étant donné le cadre de cette étude, de passer successivement en revue tous les mémoires qui abondent sur ce sujet et d'envisager la question jusque dans ses menus détails, nous devons nous borner à signaler ce qui a été dit d'essentiel dans l'ensemble, réservant un plus ample développement au chapitre particulièrement intéressant du cancer. Pour apporter plus de netteté dans le sujet et obvier à une énumération ennuyeuse et plus ou moins incohérente, nous grouperons les affections qui s'accompagnent d'une modification du pouvoir antifermentaire d'après les causes auxquelles ces variations semblent devoir être rapportées, causes dont nous ferons ensuite la discussion.

1° Maladies du tube digestif au cours desquelles il se produit des lésions importantes de la muqueuse intestinale au niveau de laquelle il y a une résorption anormale de trypsine. — A part les cas de *cancer* que nous étudierons dans un chapitre spécial et qui relèvent surtout d'une autre cause, c'est principalement dans les *entérites chroniques* accompagnées de délabrements de la muqueuse que le pouvoir antitryptique du sérum a été trouvé élevé, dans la *dysenterie amibienne ou non*, en particulier.

Au cours de la *fièvre typhoïde*, à l'exception de WIENS (²⁸³), JOCHMANN et KANTOROVICZ (¹³³), tous les auteurs: MEYER (¹⁷⁵), POGGENPOHL (²⁰⁵), HORT (¹¹⁴), RABINOVITCH (²¹¹), ZLATOGOROFF et SCHEREMIZINSKAYA (²⁹⁰) ont noté pendant la crise une augmentation de l'indice, suivie d'une baisse pendant l'apyrexie.

2° Maladies accompagnées d'une forte destruction des leucocytes dans des conditions telles qu'il y ait résorption par l'organisme du ferment leucocytaire libéré (pneumonie, suppurations fermées diverses, plaies de guerre).

Pneumonie

Les observations premières d'ASCOLI et BEZZOLA (⁹) (1903) n'ont pas été controversées par les expérimentateurs qui ont suivi, POGGENPOHL, CHIAROLANZA (⁵⁰), CARPI (⁴⁶), GOLLA (⁹³), JOBLING, PETERSEN et EGGSTEIN (¹²⁶), FIESSINGER et BAUFLE (⁷²), STEVENIN. Tous s'accordent à reconnaître une augmentation des plus nettes du pouvoir antitryptique au cours de la pneumonie. La courbe affectée par cette valeur serait à peu près constante et se traduirait d'abord par une élévation jusqu'au début de la crise, ensuite un plateau suivi d'un abaissement graduel à la normale, quand s'amendent les phénomènes locaux. D'après BITTORF (²³) il se produirait parfois une chute brusque au moment de la crise, baisse d'ailleurs passagère suivie d'un accroissement, et très vraisemblablement attribuable à l'effet neutralisateur du ferment protéolytique accumulé dans le sang à cette période.

Dans la *broncho-pneumonie* la même augmentation serait de règle. (POGGENPOHL, STEVENIN).

Suppurations.

Une augmentation des plus nettes du pouvoir antitryptique semble aller de paire avec la présence d'une collection purulente fermée, quel que soit son siège (*pleurésie purulente enkystée*, *salpingite purulente*, *appendicite suppurée*). Les observations rapportées par LANDOIS (¹⁴⁵), LUST, YAMANOUCHI, WEINBERG (²⁷⁰), STEVENIN, KRYM (¹⁴³), ZLATOGOROFF et SCHEREMIZINSKAYA sont des plus concluantes à cet égard. Pour ces trois derniers auteurs, il y aurait même un certain parallélisme entre la gravité de la suppuration et l'ascension constamment progressive de l'indice antitryptique.

WEINBERG (²⁷²) souligne par ailleurs tout l'intérêt de la réaction pour établir un pronostic différentiel dans les cas de *kyste hydatique*, un indice élevé permettant d'affirmer presque avec certitude la présence d'un *kyste suppuré*. Elle serait, d'une façon générale, d'un grand secours pour le diagnostic des abcès des organes internes, surtout des abcès à polynucléaires.

Blessures

Nous devons ici une mention toute particulière aux travaux de ZUNZ et GOWAERTS (²⁹³⁻²⁹⁴), qui, au cours de la dernière

guerre, ont étudié (méthode de Mett) à l'ambulance de la Panne, les variations du pouvoir antitryptique chez les blessés. Nous rapportons ici leurs conclusions : alors que les contusions ou les fractures minimales n'ont guère de répercussion sur les propriétés antifermentaires du sérum, les fractures fermées des membres entraîneraient un accroissement, d'ordinaire passager, de ces mêmes propriétés. Le pouvoir antitryptique serait conditionné par le traumatisme initial et le degré de la fièvre. Il y aurait un certain parallélisme entre la courbe de température et celle de l'indice antitryptique dont les variations seraient par ailleurs, sans relation avec celles de la teneur du sérum en réserve alcaline.

Les *intoxications par gaz suffocants ou lacrymogènes* ne s'accompagneraient pas de modification appréciable du pouvoir antiprotéolytique du sérum.

Signalons en terminant ce paragraphe, certaines maladies infectieuses chroniques au cours desquelles on a noté, de façon fort irrégulière, des variations du pouvoir antitryptique, variations toujours en fonction de cette destruction leucocytaire qui constitue la raison de l'apparente discordance des faits.

C'est ainsi que dans la *tuberculose*, l'indice est des plus variables et il ne paraît dépendre que de la suppuration des nodules tuberculeux et de l'infection secondaire (WEINBERG et RUBINSTEIN).

En ce qui concerne la *syphilis*, les résultats sont de même des plus contradictoires : cette affection ne semble pas influencer directement le pouvoir antifermentaire du sérum dont la recherche ne saurait, pas plus que dans la tuberculose, donner d'utiles indications diagnostiques.

3° Affections s'accompagnant d'une destruction des différentes cellules organiques (cancer, intoxications). — Dans ce groupe se classent surtout les affections néoplasiques qui par ailleurs relèvent aussi en partie des précédentes causes, et les intoxications diverses que nous étudierons dans le chapitre suivant plus particulièrement consacré à la pathologie expérimentale.

Pouvoir antitryptique du sérum et cancer

C'est MARCUS (¹⁶⁷) (1908) qui a signalé pour la première fois un indice antitryptique élevé chez un cancéreux, fait confirmé la même

année, sur un plus grand nombre de cas, par BRIEGER et TREBING (³²). Depuis les mémoires de ces auteurs, les observations se sont multipliées. BERGMANN et MEYER, HERZFELD (¹¹⁰) (1908), BRAUNSTEIN (²⁷), EISNER, BECKER (¹⁵), POGGENPOHL (²⁰⁶) (1909) en Allemagne, HORT (¹¹⁴) et WANSEY BAYLY (²⁶⁶) la même année en Angleterre, WEIL (²⁶⁸) en Amérique, J. CHARLES ROUX et SAVIGNAC (²²⁴), WEINBERG et MELLO (²⁷⁴⁻²⁷⁵) (1910), STEVENIN (1911) en France, pour ne citer que les principaux, ont été conduits par des méthodes diverses à des résultats du même ordre.

Seuls LANDOIS (¹⁴⁵) et WIENS (²⁸²⁻²⁸³) sont un peu moins affirmatifs. Retrouvée par UGO MELLO (¹⁷¹) chez des Chevaux cancéreux, la réaction antitryptique n'a été réellement contestée que par LAUNOY (¹⁵⁰) (1909) dont les résultats négatifs sur des Chiens porteurs de lymphosarcomes spontanés et d'inoculation doivent être plutôt rapportés, d'après l'auteur lui-même, à la nature encore très discutée de ces tumeurs.

Au total, dans 75 % en moyenne des cas étudiés (plus de 800), la réaction se serait montrée positive. De prime abord ces chiffres par eux-mêmes ne manquent pas d'être impressionnants : nous en ferons plus loin la discussion.

Les quelques observations de WEINBERG, HORT et YAMANOUCHI relatives au retour à la normale, après opération de la tumeur, d'un indice primitivement élevé, celle de BRIEGER (³¹) concernant une élévation de l'indice consécutive à une récurrence, sont par ailleurs en elles-mêmes des plus intéressantes. (Notons en passant qu'elles mériteraient cependant d'être complétées par d'autres). Toutes ces données plaident plutôt en faveur de cette réaction en tant que moyen indirect de diagnostic des affections néoplasiques. WEINBERG, Ch. ROUX et SAVIGNAC sont des plus catégoriques à cet égard ; ils prétendent que, dans l'ensemble des renseignements fournis par la clinique et le laboratoire, la réaction antitryptique est celle qui doit contribuer le plus à établir un diagnostic différentiel. Une réaction positive serait pour eux d'une valeur incontestable. On ne saurait pas moins méconnaître par ailleurs l'importante signification d'une épreuve négative qui permettrait, toujours d'après ces auteurs, dans le cas où le diagnostic est hésitant, d'éliminer presque à coup sûr l'hypothèse de cancer. Au cours de leurs observations, et les nôtres sont en concordance avec elles à ce sujet, il n'aurait jamais été relevé en effet de

cas de malade atteint de néoplasme certain ou très vraisemblable, présentant un pouvoir anti au-dessous de la normale.

Cette augmentation, sans être absolument caractéristique du processus néoplasique relèverait des trois facteurs suivants : destruction des leucocytes, destruction des cellules cancéreuses, destruction des cellules de l'organe touché. Il s'agirait, comme nous le verrons dans la suite, d'un anticorps élaboré par l'organisme, d'un ferment de défense contre les ferments protéolytiques libérés du fait de la destruction des éléments cellulaires mentionnés. Ainsi se trouveraient expliqués, par le jeu de ces divers facteurs dont le rôle n'est pas toujours des plus constants, les cas où il y a augmentation de l'indice antitryptique sans intervention leucocytaire par exemple, l'action de l'un rendant compte de l'absence de l'autre.

D'après les auteurs précédemment cités, la réaction antitryptique serait ainsi de première importance. Il ne semble pas cependant que l'on doive adopter aussi rigoureusement cette manière de voir et on ne saurait attacher à cette détermination la valeur absolue que certains ont été tentés de lui accorder trop volontiers.

Il convient d'abord de remarquer, et ceci a été noté par tous les auteurs, que cette réaction n'est pas spécifique du cancer. On a trouvé un indice élevé dans un grand nombre d'affections dont il a été fait mention au cours de ce chapitre. Il y a lieu de noter par ailleurs que si la majorité des cas de cancer s'accompagne d'une augmentation du pouvoir antitryptique, il en reste un nombre important qui ne donne lieu à aucun accroissement. Le fait d'autre part que la valeur du pouvoir antifermentaire du sérum, indépendante du siège de la tumeur, n'est pas constamment, ainsi que nous avons pu d'ailleurs le constater, en rapport avec son importance, ses dimensions, et qu'elle ne serait pas abaissée, d'après HORT, du fait du traitement par les rayons X., doit nous rendre très prudent dans l'interprétation de cette réaction. On ne saurait oublier en ces sortes d'épreuves qu'il n'existe pas de limites absolument tranchées entre le normal et l'anormal et que de très faibles variations n'autorisent pas à conclure d'une façon aussi définitive que l'ont fait certains expérimentateurs.

L'importance manifeste des précédentes conclusions ne pouvait manquer, au cours d'un travail d'ensemble sur les antidiastases de nous inciter à apporter dans cette question notre contribution personnelle et à prendre parti dans le débat.

Nos examens ont porté sur 15 sérums dûs, les uns à l'obligeance de M. le Docteur REGAUD de la consultation du cancer à l'Hôpital Pasteur, les autres prélevés dans divers services de l'Hôpital Laënnec et de la Pitié. Ces sérums provenaient de malades atteints de néoplasmes divers se répartissant comme suit :

- 2 néoplasmes de la face.
- 3 néoplasmes de la langue.
- 4 néoplasmes de l'appareil gastro-intestinal.
- 1 néoplasme du sein.
- 4 néoplasmes du col utérin.

Pour la plupart, il ne s'agissait que de malades atteints de cancers certains i. e. vérifiés soit à l'autopsie, à l'opération ou par examen direct. Pour quelques autres, (néos de l'appareil digestif) tout au point de vue clinique: symptômes fonctionnels et physiques, examens de laboratoire, radioscopie, évolution, affirmait ce diagnostic avec la dernière évidence.

Nous avons réprouvé en même temps et, ceci est de la plus grande importance étant données les variations assez notables dont nous avons pu nous rendre compte, une série de 8 sérums d'individus normaux de 18, 22, 35, 42 ans (sérums négatifs à la réaction de B. W. et à l'antigène de BESREDKA). Ces valeurs ont été complétées par celles précédemment obtenues par LAUNOY, dont nous avons adopté la méthode.

Les chiffres trouvés pour les optima ont été les suivants :

	Sérums normaux	Sérums cancéreux
Optimum approché ..	0 cc. 03 - 0 cc. 06	0 cc. 03 - 0 cc. 05
Optimum réel	0 cc. 06 - 0 cc. 1	0 cc. 04 - 0 cc. 06

Ces valeurs se sont ainsi réparties en ce qui concerne l'*optimum réel* (valeur la plus importante), pour les sérums normaux :

5 sérums avec	0 cc. 06
2 —	0 cc. 07
1 —	0 cc. 08
1 —	0 cc. 09

N°	SÉRUMS CANCÉREUX	AGE du malade	ACIDITÉ acquise par le témoin trypsine	TAUX d'acidification en présence de 0.04 de sérum	OPTIMUM réel
			en NaOH N/10		
A.	Néoplasme app. digestif .	52 ans	1 cc. 2	0 cc. 975	0 cc. 04
C.	— du col utérin .	32 —	—	0.875	0.06
B.	— app. digestif .	49 —	1 cc. 15	0.760	0.04
D.	— du sein . . .		—	0.925	0.04
G.	— lèvre inf. et menton	66 —	1 cc. 3	1.1	0.04
H.	— du nez . . .	44 —	—	1.050	0.04
I.	— du col utérin .	41 —	—	1.150	0.05
J.	— du colon ascend.		—	1.125	0.06
L.	— app. digesif .	65 —	—	1.2	0.06
Q.	— de la langue .	48 —	—	1.250	0.06
S.	— du col utérin .	40 —	—	1.2	0.05
O.	— — . . .	68 —	1 cc. 325	1.150	0.05
P.	— de la langue .	50 —	—	1.1	0.06 ^{zéro} d'acid.
R.	— — . . .	63 —	—	1.125	0.05 —

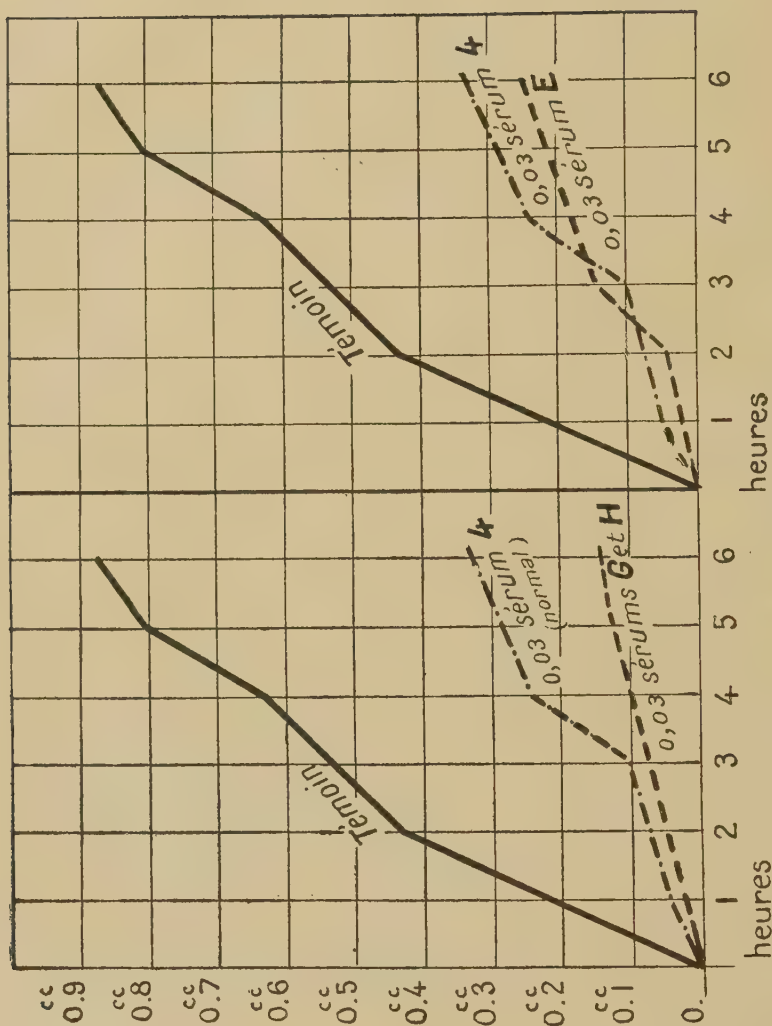
	SÉRUMS NORMAUX				
1.			1 cc. 2	1.050	0.06
2.			—	0.950	0.07
3.			—	1.2	0.09
4.			1 cc. 3	1.1	0.06
5.		22 ans	1 cc. 35	1.150	0.06
6.		16 —	—	0.975	0.08
7.		40 —		1.075	0.06
8.		35 —	—	1.150	0.06
9.		42 —	—	1.225	0.07

Tableau 3

pour les sérums cancéreux :

6 sérums avec 0 cc. 06 (dont 1 avec zéro d'acidité.)
 4 — 0 cc. 05 — —
 5 — 0 cc. 04

Sur les 15 sérums examinés, 9 se sont ainsi montrés plus antitryptiques que la normale et 5 surtout d'une façon très nette. Les 6 autres ont accusé un indice normal, mais plutôt élevé.



Graphiques 1 - 2 — Action antitryptique de sérums humains normaux et néoplasiques. Courbes de protéolyse dans le temps en présence de quantités fixes (0 cc. 3) de sérums.

(Le trait plein indique la marche normale de l'hydrolyse tryptique de la gélatine sans sérum. On a porté en abscisses les temps en heures et en ordonnées les quantités de NaOH N/10 nécessaires à la neutralisation de chaque essai).

Ces valeurs ont été complétées par l'examen comparatif des courbes de protéolyse après 18 heures d'étuve à 41° et des courbes d'hydrolyse dans le temps en présence de quantités fixes de sérums (0 cc. 01 et 0 cc. 03). Ces déterminations, qui traduisent d'une façon plus sensible la marche des phénomènes, nous ont conduit à des résultats moins positifs et doivent pour le moins nous rendre plus circonspects dans nos conclusions. Alors que certains graphiques de protéolyse dans le temps parlent nettement en faveur d'une augmentation (*Graphiques 1-2*), certaines courbes d'hydrolyse après 18 heures, (celle du sérum H. par exemple, cancer absolument typique, optim. réel 0,04) bien différentes par leur allure de celle du sérum normal 4, se confondent par ailleurs sensiblement avec celle d'un autre sérum normal (sérum 6 de pouvoir anti assez élevé il est vrai. (*Graphiques 3-4*).

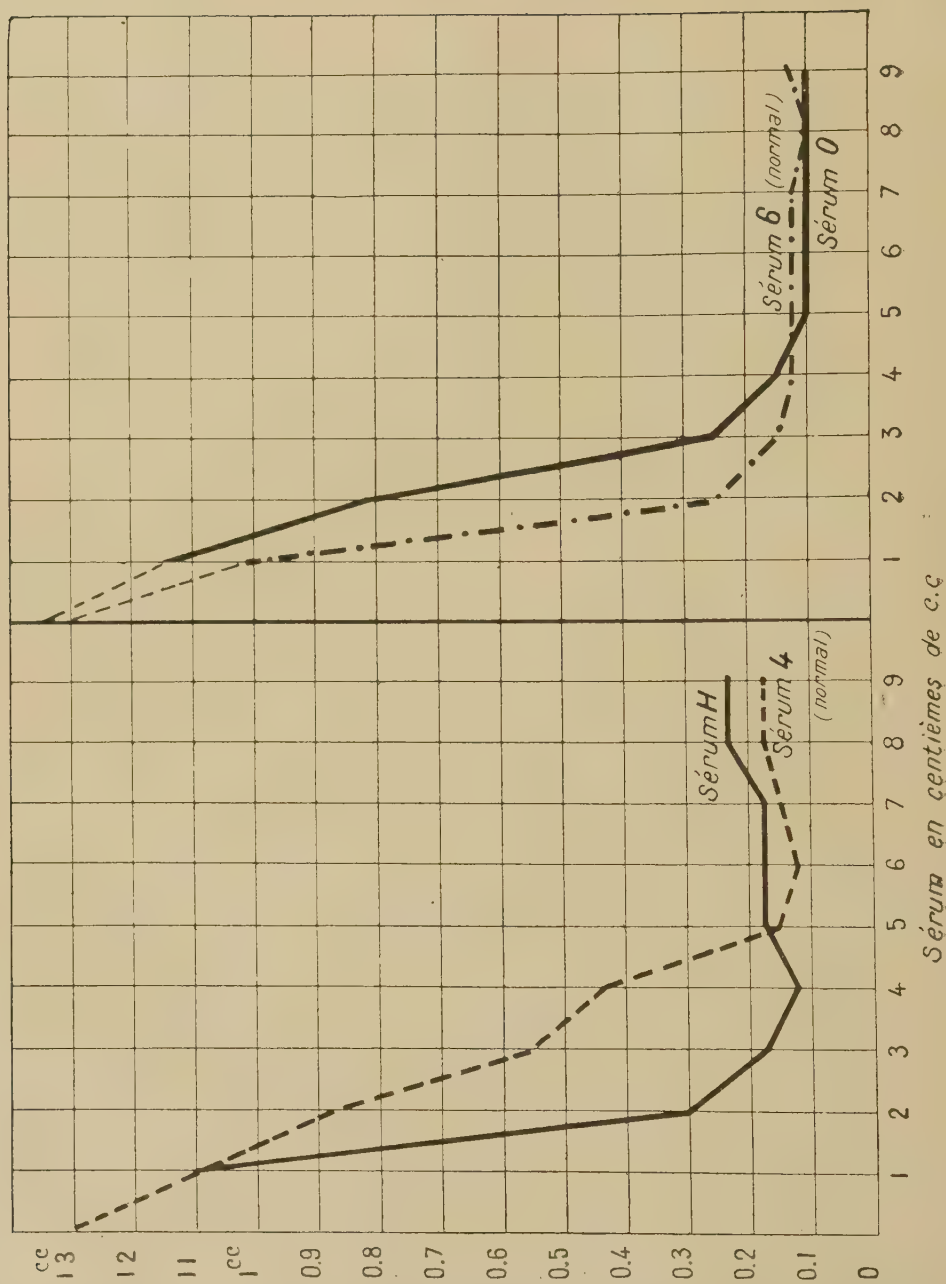
On voit combien ces réactions sont d'une interprétation difficile et délicate. Aussi nous montrerons nous dans nos conclusions un peu moins absolu que WEINBERG (²⁷¹⁻²⁷²). De l'ensemble des précédentes observations, il nous est seulement permis de déduire que *le pouvoir antitryptique du sérum au cours du processus néoplasique est généralement fort et que dans un grand nombre de cas il se montre au-dessus de la normale* (Opt. réel : 0,06).

Cette augmentation est légère : mais dans des phénomènes biologiques de cet ordre on ne saurait s'attendre à de grosses modifications.

Un indice élevé ne peut, à côté d'autres faits cliniques, que venir étayer un diagnostic hésitant ; il ne saurait à lui seul, l'affirmer avec certitude.

En l'absence de tous autres signes, il semble qu'un indice faible, au-dessous des limites normales, puisse constituer un argument sérieux susceptible de faire écarter l'idée de cancer.

Enfin nous noterons en terminant que toutes les observations relatives jusqu'ici n'ont trait qu'à des cas de cancers parvenus à un stade assez avancé de leur développement. Il ne serait surtout pas sans intérêt d'étudier les modifications antifermentaires du sérum au cours d'un processus cancéreux, dont l'évolution serait susceptible d'être saisie à son début et suivie d'une façon visible dans ses diverses phases (cancer du sein par exemple) : la réaction antitryptique acquerrait une réelle valeur clinique, si elle se révélait capable de



Graphiques 3-4 — Action antitryptique de sérums humains normaux et néoplasiques — Courbes d'hydrolyse après 18 heures à 41° en présence de quantités variables de sérums.

(On a porté en abscisses les quantités de sérums en centièmes de cc. et en ordonnées les quantités de Na OH N/10 nécessaires à la neutralisation de chaque essai).

dépister un néoplasme en voie de formation. Elle ne prendra de l'importance qu'autant qu'elle pourra être érigée en méthode de diagnostic précoce de cette affection.

II. — Pathologie expérimentale.

Causes de ces variations. Origine.

A.—L'identification de l'antitrypsine avec un anticorps ne paraît pas contestable. Il semble s'agir là d'une réaction de défense, dirigée selon toute évidence d'abord contre la trypsine pancréatique. La possibilité de réaliser à la suite d'injections répétées une véritable immunisation atteste déjà cette manière de voir contre laquelle on ne saurait arguer de la précoce apparition d'anticorps antitryptiques 24 heures parfois après l'injection. GAEHTGENS (⁷⁸) (1908) n'a-t-il pas montré la présence d'agglutinines microbiennes au bout de 24 heures ? Il n'est pas douteux que la résorption de la trypsine joue un rôle important dans les variations du pouvoir antifermentaire du sérum.

AMBARD (⁵) (1908) a attribué en partie à une suppléance fonctionnelle du pancréas l'augmentation d'antitrypsine notée par lui dans certains cas de cancer de l'estomac, un indice anti élevé étant corrélatif d'une augmentation de la trypsine dans les fèces. Contestée par SCHLECHT et WIENS (²³⁷), SCHORLEMMER et SELTER (²⁴⁰), MIESOWICZ et MACIAG (¹⁸¹) (1909) qui n'auraient pas constaté de parallélisme constant entre la sécrétion pancréatique et le pouvoir antitryptique, l'opinion d'AMBARD paraît parfaitement conciliable avec les faits cliniques en apparence contradictoires rapportés par ces auteurs.

L'hypersécrétion pancréatique, encore que bien discutée d'ailleurs, des cancers gastriques, n'implique pas d'abord nécessairement l'idée d'une résorption exagérée du ferment. Cette dernière ne saurait avoir lieu que dans les cas où il y a en plusieurs points de la muqueuse intestinale des plages d'ulcération, d'inflammation au niveau desquelles une absorption anormale puisse avoir lieu. WEINBERG a toujours constaté en effet un indice élevé chez des malades présentant des lésions ulcéreuses étendues de l'intestin. De ce fait une ré-

sorption anormale peut même coïncider parfaitement avec une sécrétion pancréatique normale ou même diminuée.

L'expérimentation n'infirme pas non plus l'hypothèse précédemment énoncée. Les constatations de ZUNZ et MAYER (²⁹⁵) (1905) qui n'auraient pas relevé de modifications du pouvoir antifermentaire chez les Chiens ayant subi la ligature des canaux pancréatiques, trouvent leur explication dans ce fait que le sérum de Chien exerce son pouvoir empêchant surtout sur la kinase intestinale. L'antitrypsine serait plutôt en réalité une antikinase. Selon DELEZENNE (³⁵), ASCOLI et BEZZOLA (⁷), DASTRE et STASSANO (⁵⁴), ZUNZ (²⁹²), BAYLISS et STARLING (¹⁴) (1905), le sérum neutraliserait beaucoup plus l'action du suc intestinal que celle du suc pancréatique.

Les expériences de COBLINER (1910) qui ne semblent pas avoir été plus parfaitement interprêtées, viennent corroborer cette manière de voir. Le fait que l'extirpation totale du pancréas chez le Chien, avec une survie de 2 ou 3 jours, n'entraîne pas de modification du pouvoir antitryptique ne doit pas en effet pour nous surprendre étant donné ce qui précède. L'extirpation partielle de la glande (survie de 2 mois, amaigrissement, glycosurie) n'est pas sans provoquer par contre une diminution notable de l'antitrypsine du sérum, que des injections de préparations tryptiques ramènent aux environs du chiffre primitif.

Dans ce même ordre d'idées, l'étude du pouvoir antifermentaire du sérum au cours du *diabète sucré* est aussi des plus intéressantes. Les observations de la plupart des auteurs (WIENS (²⁸²), MARCUS (¹⁶⁷⁻¹⁶⁸), BRIEGER et TREBING (³²), NEISSER et KOENIGSFELD (¹⁹³), relèvent en effet une diminution en rapport avec l'insuffisance glandulaire.

Enfin, chez les animaux inanitiés, nous avons vu que le pouvoir anti accusait une chute et l'on sait que dans ce cas la sécrétion des ferments digestifs est minime. Il résulte de tout ce qui précède que *la résorption de la trypsine intervient sans aucun doute dans l'élaboration des substances antitryptiques.*

B.—L'existence dans les leucocytes du pus et du sang circulant d'un ferment protéolytique, l'identité de ce ferment et de la trypsine, nous semblent suffisamment établies pour que nous ne revenions pas sur ces faits. Il n'est pas contradictoire en soi d'admettre que la

montée des substances antitryptiques dans le sérum puisse relever dans certains cas de la mise en liberté, sous des causes variées, de ce ferment leucocytaire. Le rôle joué par la résorption de ce ferment est attesté par les observations cliniques précédemment rapportées (ASCOLI et BEZZOLA, BITTORF et WIENS, MÜLLER et LANDOIS). L'élévation marquée de l'indice antitryptique corrélative de la production d'abcès microbiens par injections sous-cutanées d'essence de térébenthine (WEINBERG et RUBINSTEIN), son augmentation dans la leucémie myéloïde, affection au cours de laquelle la cytolysé leucocytaire est intense, parlent aussi en faveur de cette hypothèse. C'est de même à la légère destruction leucocytaire consécutive à l'injection de corps microbiens que doit être rapporté, semble-t-il, dans ce cas l'augmentation assez faible d'ailleurs de l'indice antitryptique. TEALE et BACH (²⁵³) (1920) à la suite d'inoculations les plus variées chez le Lapin: bactéries pathogènes, protéines non toxiques par elles-mêmes (globules rouges, albumine d'œuf, gélatine), bactéries pathogènes (*B. coli*, *B. d'Eberth*, *B. mycoïdes*, *B. anthracis*, *M. lanceolatus*...) exotoxines tétanique et diphtérique, bactéries sensibilisées, ont noté d'abord une chute variable en durée (environ 8 heures) et en valeur (généralement de 20 %), à laquelle succède une phase positive de 48 à 96 heures. Cette variation de l'indice antitryptique, signalée aussi par JOBLING, PETERSEN et EGGSTEIN (¹²²), ne serait par ailleurs nullement proportionnelle à l'intensité de l'infection ou à la toxicité de la protéine inoculée, ni conditionnée par la sensibilisation de l'antigène ou l'immunisation. Ce dernier point est toutefois contesté par KRAUSE et KLUG (¹⁴²) pour lesquels le pouvoir antitryptique augmenterait régulièrement chez des Chevaux, en même temps que le pouvoir antitoxique au cours de l'immunisation contre la toxine diphtérique. La neutralisation de la toxine par l'antitoxine provoquerait en outre une augmentation du pouvoir antitryptique, ce qui fait conclure aux auteurs que certains anticorps possèdent un pouvoir tryptique masqué par le pouvoir empêchant du sérum et qu'il y aurait peut-être lieu de tirer de ces faits une méthode de dosage des sérums thérapeutiques qui dispenserait des épreuves sur l'animal.

C'est à des constatations du même ordre qu'ont été conduits WEINBERG et RUBINSTEIN (1912) en injectant des Chevaux de toxines tétanique ou diphtérique et de cultures diverses (*Streptococcus pyogenes*, *B. de Hansen*..).

Quant à l'absence d'absolu et constant parallélisme invoqué par de nombreux auteurs entre le degré de la leucocytose et les variations du pouvoir antifermentaire, elle ne saurait nullement infirmer la théorie du ferment leucocytaire considéré comme antigène de l'antitrypsine. Pour qu'il se produise un accroissement de l'antiferment il faut qu'il y ait *destruction des globules et libération de la protéase leucocytaire*. Cette cytolysé indispensable, qui n'accompagne pas nécessairement la leucocytose, donne la raison des résultats en apparence paradoxaux de SCHLECHT et WIENS (1909), YURGENSOHN (1910), WEINBERG et RUBINSTEIN (1912), CITRONBLATT (⁵⁴) (1912), ZLATOGOROW et SCHE-REMIZINSKAYA (1918), ZUNZ et GOWAERTS (1916). Le fait que l'injection de substances qui déterminent une leucocytose intense (solution de peptone de Witte, d'aliment Mellin, de sels doubles de spermine et de chlorure de sodium) est sans influence sur le pouvoir antitryptique du sérum, établit bien que c'est la destruction leucocytaire seule qui est en cause.

C.—Il est une autre cause à laquelle on a voulu rapporter les variations de l'action antitryptique du sérum. Les ferments protéolytiques des organes et des tissus normaux et pathologiques, dont l'existence est incontestable (cellules hépatiques, placentaires, cancéreuses..) ne seraient pas, selon certains auteurs, sans exercer un rôle important. Encore que très vraisemblable, cette intervention est fortement contestée. Les arguments invoqués par les parties adverses reposent sur des considérations cliniques pour la plupart toutes précédemment exposées, et sur l'expérimentation.

L'augmentation du pouvoir antitryptique au cours des *intoxications* par les substances qui déterminent des lésions dégénératives du foie, des reins, serait pour un très grand nombre d'expérimentateurs un fait constant et suffisamment établi pour affermir l'hypothèse des ferments cellulaires considérés comme anticorps.

WELSCH (²⁷⁹) (1908) a montré que la cellule hépatique met en liberté, dans l'intoxication phosphorée, une certaine quantité de ferment protéolytique. Au cours de l'intoxication par la phloridzine, le phosphore, le chloroforme, BRAUNSTEIN et KEPINOW (²⁹) (1910), OPIE, BARKER et DOCHEZ (¹³⁹) (1911) ont relaté que de graves lésions hépatiques, accompagnées d'une diminution de la coagulabilité du sang allaient de paire avec une ascension de l'indice antitryptique.

LAUNOY (¹⁵²) (1911) a vérifié l'exactitude de ces résultats chez les Lapins intoxiqués par la ricine.

De même dans les *néphrites expérimentales*, au cours d'intoxications par le nitrate d'urane, l'acide chromique, le sublimé, l'augmentation de l'antiferment dans le sang serait d'après HIRATA (¹¹³) (1910) des plus constantes et des plus nettes.

PFEIFFER et de CRINIS (²⁰³) (1913) arrivent à des conclusions du même ordre en ce qui concerne les *brûlures expérimentales* après anesthésie par le chloroforme et l'éther. Dans le cas de brûlures relativement bénignes, portant seulement sur le 1/6^e ou le 1/8^e de la surface du corps, on observerait au bout de 3 heures une augmentation du pouvoir antiprotéolytique, laquelle serait encore plus notable pour des brûlures plus étendues qui n'atteindraient pas toutefois le degré mortel.

A l'appui de cette origine autolytique de l'antitrypsine, il convient de rapporter les expériences de GOLLA (⁹⁴) (1909) qui a observé une augmentation de l'antiferment après injection d'autolysat de foie ou de rein de Lapin. BRAUNSTEIN et KEPINOW (1910) à la suite d'implantation aseptique sous la peau ou la cavité abdominale chez le Lapin et le Cobaye de fragments de tissus hépatiques ou néoplasiques ont noté pendant la période de résorption de ces tissus un pouvoir antitryptique nettement élevé : ces auteurs signalent par ailleurs que l'introduction de tissus ayant subi 15 minutes d'ébullition ne provoque aucune modification dans le titre du sérum.

Le parallélisme relevé entre l'excrétion de l'azote provenant des cellules de l'organisme et l'augmentation du pouvoir antitryptique, constituerait ainsi un argument en faveur de la thèse précédemment soutenue et confirmée encore par les observations de K. MEYER (¹⁷⁵) qui constate, à la suite d'injections d'extrait de corps thyroïde, une élévation du pouvoir antifermentaire corrélatrice d'une augmentation de l'excrétion azotée. Pour BRAUNSTEIN (²⁸) (intoxication par la phénacétine), il y aurait ainsi un accroissement constant de l'indice chaque fois qu'il y a un bilan azoté négatif ce que LUST (¹⁶⁴) aurait confirmé dans l'intoxication intestinale grave du nourrisson.

De là, à faire de l'augmentation du pouvoir antitryptique une réaction de la cachexie, il n'y avait qu'un pas. BRIEGER et TREBING (³)

n'ont pas hésité à le franchir, un peu trop hardiment croyons-nous. Si HERZFELD (1908) BRAUNSTEIN, EISNER, FURST (1909), JACOB, LUST, MARIE et ROCHE (²¹⁷) partagent l'opinion de ces auteurs, elle est vivement combattue par contre par un certain nombre d'autres savants : BERGMANN et MEYER, LANDOIS, POGGENPOHL, FINZI, WEINBERG et STEVENIN pour lesquels il n'y aurait pas de parallélisme entre la réaction antitryptique et un état de dénutrition. Sans tenir un compte absolu, étant donnée l'intervention possible dans ce cas particulier d'autres facteurs, des observations relatant une élévation de l'indice chez des cancéreux non cachectiques, nous voulons bien admettre que cette réaction n'est pas aussi générale que l'ont prétendu BRIEGER et TREBING. Si l'on se rappelle par ailleurs les résultats tout opposés auxquels ont été conduits, en ce qui a trait particulièrement à l'intoxication phosphorée, LOEPER et ESMONET (1908), COBLINER et plus récemment TEALE et BACH (²⁵²) (1920), on comprendra toute la réserve de laquelle on ne saurait se départir, avant que de nouvelles expériences conduites avec toute la rigueur désirable apportent sur la question une solution définitive.

Notons toutefois que, d'après ces derniers auteurs, il y aurait destruction par le phosphore des enzymes cellulaires elles-mêmes, ce qui n'est point sans importance et rend compte de la diminution considérable par eux notée et équivalent en fait à une destruction de l'antiferment. Ces données sont à rapprocher de certaines expériences de PFEIFFER et de CRINIS (²⁰³) qui, dans certains cas de brûlures graves avec issue fatale et à marche rapide, n'observaient pas de changement et même une chute de l'indice antitryptique.

Il est un autre fait dont nous devons faire mention et qui peut constituer en lui-même une preuve indirecte en faveur du rapport du sérum et des ferments d'autolyse : nous voulons faire allusion à l'action empêchante que ce dernier exerce sur ces ferments. BAER (1906), LOEB ont constaté un ralentissement de l'autolyse du foie en présence de sérum sanguin.

LAUNOY (¹⁴⁹), au cours de son important mémoire de 1909, a noté l'action inhibitrice du sérum sur cette même autolyse aseptique du foie. Même après 50 heures d'étuve, il n'y aurait aucune modification de nécrose autolytique dans le plus grand nombre de cellules. Cette influence retardataire du sérum, reconnue par TEALE et BACH (²⁵²) en ce qui concerne la dégradation autolytique des leucocytes

et de la moelle, est seulement contestée par ces auteurs vis-à-vis de l'autolyse du foie. Tout au moins ils ne l'admettent que dans la mesure où le sérum modifie la concentration en ions H dont dépend l'autolyse.

En définitive, malgré les quelques contestations précédemment développées, *il ne nous paraît pas inadmissible que les ferments endocellulaires puissent, à un degré moindre et plus particulièrement dans certains états pathologiques, conditionner en partie l'état antifermentaire du sérum.*

CHAPITRE III

Pouvoir antitryptique du sérum et choc anaphylactique.

Cette étude ne serait pas complète si nous ne consacrons quelques pages à l'état du pouvoir antitryptique au cours du choc anaphylactique. L'intérêt de cette question s'accroît de l'importance du point de vue théorique que certains auteurs ont voulu dégager de leurs conclusions ; aussi étant donnés par ailleurs les résultats contradictoires auxquels ont été conduits les expérimentateurs, ne nous a-t-il pas paru inutile de reprendre la question.

Pour PFEIFFER (²⁰²) et KURT MEYER (¹⁸⁰) (1913) les phénomènes de choc anaphylactique s'accompagnent d'une diminution rapide du pouvoir antifermentaire. JOBLING et ses collaborateurs (^{120 à 123}) (1915) concluent dans le même sens et rapportent ce fait à une modification colloïdale du sérum résultant de la saturation des lipoïdes (antiferments) par l'antigène. Cette adsorption de l'antiferment aurait pour conséquence une autodigestion du sérum, avec formation de protéoses toxiques et augmentation de l'azote non coagulable. Ces faits seraient à rapprocher, d'après ces auteurs, de la mort rapide consécutive à l'inoculation intraveineuse d'une suspension d'agar ou de kaolin qui en provoquant, toujours selon JOBLING (¹²⁷), une même adsorption de l'antiferment, déterminerait des phénomènes toxiques du même ordre. Nous verrons dans la suite ce que l'on doit penser de ces expériences controversées par celles de TEALE et BACH et les nôtres.

D'après RUSZNYAK (²³²⁻²³³) (1912 et 1920) au contraire, l'accroissement du pouvoir antitryptique du sérum serait un des caractères du choc anaphylactique : cet accroissement, que l'auteur explique

par la brusque apparition dans le sérum des produits de la désintégration protéique, n'aurait toutefois été noté que pendant la saison d'été où la sensibilité des animaux est moins grande qu'en hiver. Ce dernier phénomène pourrait être rapproché, pour RUSZNYAK, de la périodicité de certaines maladies.

Enfin ANDO ⁽⁶⁾ (1913) TEALE et BACH ⁽²⁵³⁾ (1920) n'observent aucune variation, au moins en ce qui concerne le choc foudroyant ; un choc atténué serait au contraire marqué par une chute légère : celle-ci serait de l'ordre de celle qui suit, chez un animal neuf, l'injection d'une quantité d'antigène égale à celle dont on se sert pour déclencher le choc chez un animal sensibilisé.

Dans ces questions, il est de première importance de bien spécifier la nature du choc que l'on détermine. Nos résultats ^(159 bis) concernent des Cobayes sensibilisés avec du sérum antidiphthérique chez lesquels nous avons déclenché un choc provoquant la mort en 4 à 5 minutes.

Technique.— Quatre Cobayes mâles de 350 à 400 gr. sont sensibilisés par voie sous-cutanée avec 0 cc. 5 de sérum antidiphthérique : 3 semaines après l'injection préparante, les animaux reçoivent par la jugulaire 0 cc. 5 ou 1 cc. de sérum.

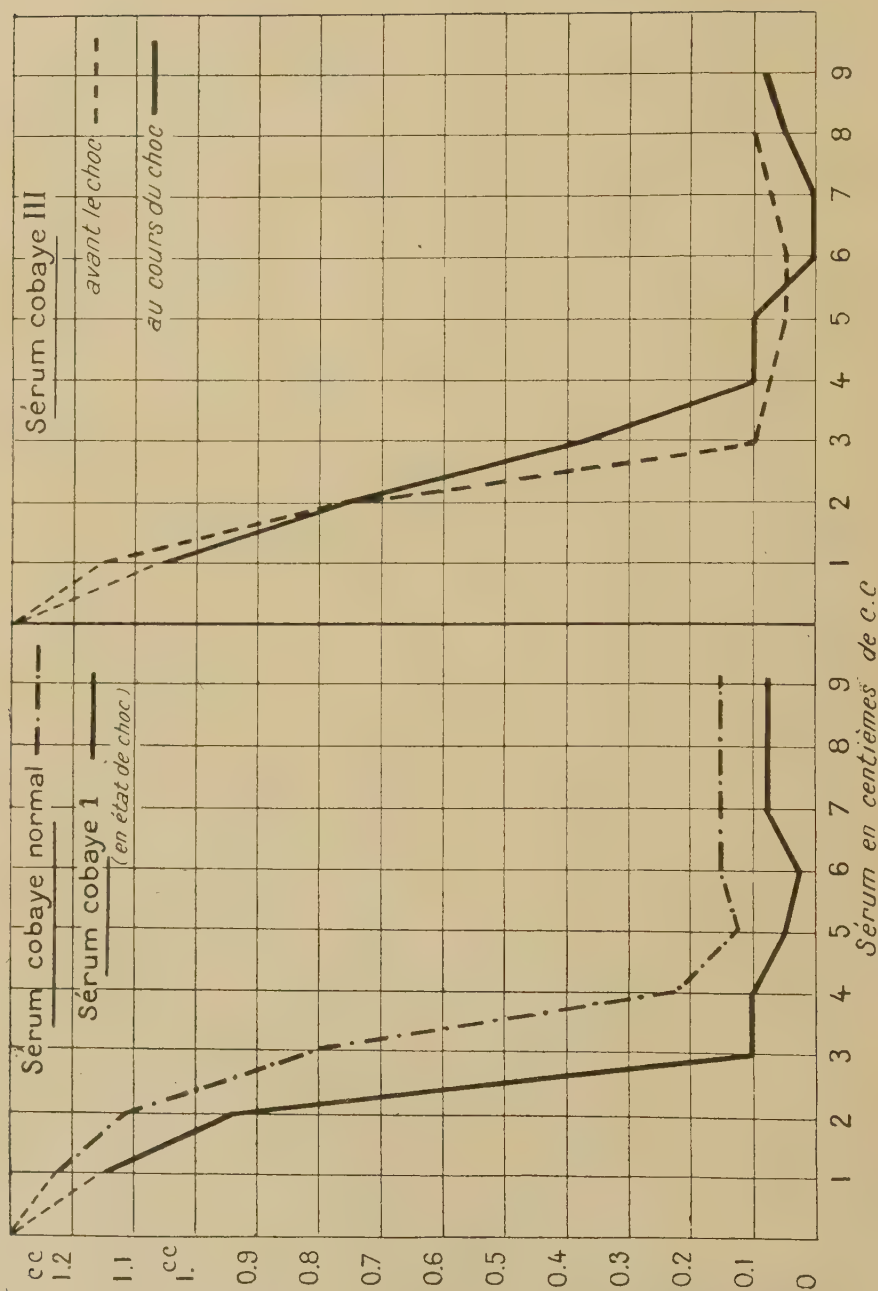
Un animal témoin meurt en 4 minutes 15 secondes, sur deux animaux le sang est prélevé par ponction carotidienne aseptique à la période ultime d'asphyxie, le cœur continuant à battre : on obtient 4 à 5 cc. d'un sang noir rapidement coagulable en un caillot se rétractant avec lenteur. Sur le quatrième animal on prélève avant déclenchement du choc 3 cc. de sang : une seconde ponction est faite dans les mêmes conditions que précédemment.

L'étude préalable d'un grand nombre de sérums de Cobayes normaux nous confirme la constance du pouvoir antitryptique du sérum de cet animal. "L'optimum approché" chez le Cobaye normal est égal à 0 cc. 05 avec une variation de 0 cc. 01 en-deça ou au-delà : l'"optimum réel" est compris entre 0 cc. 07 et 0 cc. 1. Pour nos quatre animaux nous avons obtenu les résultats suivants.

Cobaye . — Prise de sang 90 secondes après l'injection déchaînante (1 cc.).

Optimum approché = 0 cc. 05.

Optimum réel = 0 cc. 06.



Graphiques 5 - 6 — Action antitryptique de sérums de Cobayes normaux et en état de choc. Courbes de protéolyse après 18 heures à 41° en présence de quantités variables de sérums.

Cobaye II. — Prise de sang 4 minutes après l'injection déchaînante (0 cc. 5).

Optimum approché = 0 cc. 04.

Optimum réel = 0 cc. 04.

Cobaye III. — Prise de sang 3 minutes avant l'injection déchaînante.

Optimum approché = 0 cc. 04.

Optimum réel = 0 cc. 05 - 0 cc. 06 (sans inhibition absolue).

Prise de sang 3 minutes 15 secondes après l'injection déchaînante (0 cc. 5).

Optimum approché = 0 cc. 04.

Optimum réel = 0 cc. 06 (avec inhibition absolue de l'action tryptique).

Cobaye IV. — Injection déchaînante de 1 cc., mort en 4 minutes 15 secondes.

La détermination du pouvoir antitryptique (méthode de LAUNOY) a été faite avec une unité tryptique identique (0 cc. 1) déterminant sur 2 cc. de gélatine dialysée, après 18 heures d'étuve à 41°, une acidité totale neutralisée par 1 cc. 35 de soude N/10.

Pour nous en tenir uniquement aux faits, les chiffres ci-dessous ajoutés à l'examen de la courbe de protéolyse ci-jointe, (*Graphiques* 5-6), nous permettent de dire que, *dans le choc anaphylactique provoquant la mort en 4 à 5 minutes, la valeur antitryptique du sérum sanguin ne varie pas sensiblement : " l'optimum approché " ne subit pas de modification, " l'optimum réel " accuse toutefois une légère augmentation.*

Ces conclusions infirment de la façon la plus absolue la théorie de JOBLING (¹²⁰) sur la production d'anaphylatoxine " in vivo "; elles concordent avec les vues de TEALE et BACH qui nient l'auto-digestion du sérum et prétendent que la dégradation protéolytique ne saurait avoir lieu du fait de l'adsorption du ferment lui-même par l'agar, le kaolin. D'après ces auteurs, la production d'anaphylatoxine " in vitro " par des substances telles que la gélose, l'amidon, les bactéries, n'entraîne aucune modification du pouvoir antitryptique, pas plus qu'un accroissement de l'azote non coagulable,

mais bien une adsorption du ferment protéolytique : la toxicité du sérum ne serait nullement conditionnée par la destruction de l'antiferment. Pour TEALE et BACH, ces morts rapides dans le choc anaphylactique, sans changement appréciable de l'indice antifermentaire, seraient dues à un caillot intra-vasculaire : elles pourraient être prévenues par une injection précédente ou simultanée d'extrait de sangsues.

Signalons en terminant, que cette même hypothèse de l'intoxication auto-protéique ne saurait non plus être invoquée, ainsi que prétendent le faire JOBLING (¹¹⁹⁻¹²⁰), VAUGHAN (²⁵⁸), TEALE et EMBLETON (²⁵⁴), pour expliquer les phénomènes de toxémie bactérienne dont l'uniformité des principaux symptômes ne pouvait, d'après ces auteurs, être rapportée qu'à une cause commune. Elle est tout d'abord en opposition avec ce fait que les bactéries n'adsorbent pas, tout au moins "in vitro", l'antitrypsine. De plus il a été établi par ailleurs par TEALE et BACH, qu'il n'y avait aucune relation entre la courbe antitryptique, la pathogénicité, la toxicité ou la virulence des bactéries.

QUATRIÈME PARTIE

Action empêchante du sérum sur les Diastases microbiennes.

Le sérum sanguin exerce son action antagoniste, avec une bien moindre intensité cependant, à l'égard des ferments bactériens. Cette action a été signalée pour la première fois en 1898 par VON DUNGERN ⁽⁶²⁾ qui constata un pouvoir antiprotéasique très net du sérum vis-à-vis du ferment staphylococcique chez un sujet atteint d'ostéomyélite. Reprise par MALFITANO ⁽¹⁶⁵⁾ en 1903 sur la *Bactérie charbonneuse*, par MORESCHI ⁽¹⁸⁵⁾ en 1904 sur le *Vibron cholérique*, HATA ⁽¹⁰⁴⁾, la même année sur les *B. fluorescens*, *liquefaciens*, et *M. prodigiosus*, ces deux derniers avec la gélatine comme test d'épreuve, cette étude fut poursuivie sur le *B. pyocyaneus* et le *M. prodigiosus* par KURT MEYER ⁽¹⁷⁸⁾ en 1911 (caséinate de soude), sur le *B. pyocyaneus* et le *B. subtilis* par BERTIAU ⁽²²⁾ en 1914 et surtout par LAUNOY ^(155 à 160) (1919) dont les travaux, que nous aurons maintes fois l'occasion de mentionner au cours de cet exposé, sont à la base de notre étude et de toute recherche nouvelle dans cette voie.

Tout dernièrement encore, BLANC ⁽²⁵⁾ 1921, au cours d'un travail sur les ferments protéolytiques des anaérobies pathogènes a noté et étudié l'action empêchante du sérum sur le *B. sporogenes* et le *B. histolyticus*, agents les plus fréquemment rencontrés dans la gangrène gazeuse.

Dans cet exposé, il ne sera traité que de l'action exercée par le sérum sur les protéases bactériennes, la seule quelque peu étudiée jusqu'ici et sur laquelle ont porté nos recherches personnelles.

CHAPITRE I

Les protéases bactériennes. - Leur préparation.

Avant d'aborder cette étude, quelques précisions sur les protéases elles-mêmes ne nous semblent point inutiles et viennent tout naturellement en tête de cet important chapitre. Parmi ceux qui ont particulièrement étudié les ferments microbiens, il convient de mentionner à côté des auteurs précédemment cités à propos des antiprotéases, ceux de H. de WAELE et VAN DE VELDE (²⁶² - ²⁶³), BERMBACH (²¹), V. GROER (⁹⁷), FERMI (⁶⁶ à ⁶⁹). De tous leurs travaux nous nous bornerons à dégager les faits essentiels, intéressant directement le point de vue qui nous préoccupe : mode de préparation, conditions optima d'activité..., etc.

On emploie la protéase précipitée par l'alcool-éther, ou plus simplement le filtrat sur bougie de cultures en bouillon peptone Martin. L'obtention de ferments actifs est étroitement conditionnée par l'âge des cultures, la composition du milieu ; le choix de la bactérie elle-même parmi plusieurs échantillons d'une même espèce n'est pas sans importance et ce sont là autant de considérations primordiales qu'on ne saurait méconnaître.

A. Choix de la bactérie.— Il y a lieu de rechercher au préalable, parmi plusieurs variétés d'une même espèce microbienne, celle qui est susceptible de fournir la protéase la plus active. Le procédé employé par LAUNOY (¹⁵⁷), et qui consiste à ensemencer avec chaque échantillon un milieu de plus en plus pauvre en sels et en substances protéiques, et vice-versa de plus en plus riche en gélatine purifiée où seules les bactéries fortement proléotyptiques peuvent se développer activement, nous semble le plus rapide et le plus adéquat pour nous fixer sur la valeur gélatinolytique d'un germe donné. Il est fait usage des milieux suivants :

- | | |
|------------------------------------|------------|
| (1) Gélatine à 10 % dialysée | 3 parties. |
| (2) Gélatine à 10 % dialysée | 2 parties. |
| Bouillon peptone..... | 1 partie. |
| (3) Gélatine à 10 % dialysée | 1 partie. |
| Bouillon peptone | 2 parties. |

que l'on répartit à la dose de 3 cc. dans des tubes, et ensemence avec une öse de culture de 18 heures en bouillon de chaque bactérie. On note, après 24 heures, 48 heures ou plus d'étuve à 37°, les tubes des divers milieux qui ont cultivé et ceux pour lesquels la liquéfaction de la gélatine, contrôlée par le refroidissement dans un bain à 10°, est totale. Les germes ainsi sélectionnés seront pris d'abord parmi les souches qui poussent dans le milieu (1) : si les résultats sont négatifs avec ce milieu, on choisira dans le milieu suivant, etc... Lorsque les résultats obtenus sont du même ordre pour plusieurs échantillons, c'est la détermination de l'unité gélatinolytique qui fixera définitivement sur celui à adopter comme test.

B. Influence de l'âge. — Le pouvoir digestif des cultures dépend de leur âge, lequel varie avec le germe microbien. C'est ainsi que, d'après BLANC, les filtrats de cultures très jeunes (moins de 6 heures) de *B. sporogenes* et de *B. histolyticus* sont inactifs sur la gélatine ; le pouvoir enzymatique n'apparaîtrait que vers la 10^e heure, augmenterait rapidement avec l'âge, pour demeurer à peu près stationnaire après le 4^e jour. Les filtrats les plus gélatinolytiques proviendraient de cultures âgées de 24 heures pour le *B. histolyticus* et de 72 heures pour le *B. sporogenes*.

Chez le *B. pyocyaneus*, le *B. subtilis*, le *M. prodigiosus*, le *Proteus*, le ferment qui existe déjà en quantité notable après 48 heures, augmente quantitativement jusqu'au 8^e jour environ, pour diminuer ensuite peu à peu. Aussi en ce qui concerne ces espèces, avons-nous fait habituellement usage de cultures de 8 jours (4 jours à l'étuve à 37°, 4 jours à la température du laboratoire). Le pouvoir liquéfiant est plus lent encore à apparaître chez le *Staphylococcus pyogenes*, le *B. anthracis*, le *Vibron de Deneke*, le *Vibron cholérique* pour lequel il faut faire appel à des cultures âgées de 15 à 23 jours.

Produits de sécrétion des microbes étant donnée la précocité parfois de leur apparition, les protéases sont donc incontestablement aussi des produits de dégénérescence, de dissolution du corps bacillaire. Leur présence ne devient manifeste qu'à la suite d'un certain nombre de divisions microbiennes et après autolyse d'une certaine quantité plus ou moins grande de bacilles. Nous n'en voulons pour preuve que l'augmentation artificielle de cette autolyse, réalisée par BLANC au moyen de chloroforme sur de jeunes cultures, et la libération du ferment consécutive à cette chloroformisation (5 à 10 min. à 18°.)

C. Influence du milieu. — La constitution du milieu, l'accès de l'air favorable en certains cas au développement de la culture, influencent aussi la production de protéase. C'est ainsi que l'addition de glucose qui paraît d'après BLANC favoriser l'apparition du ferment du *B. histolyticus* est nettement défavorable pour le *B. sporogenes*. De même la présence de gélatine favorisante, indépendamment de la dose employée, pour la protéase pyocyanique, l'est seulement à doses fortes pour le *B. subtilis*.

Nous avons vu que l'on pouvait partir, soit de la protéase précipitée, soit de filtrat. En certains cas il nous est arrivé de faire usage de cultures vivantes, non filtrées, simplement centrifugées.

1° Emploi de la protéase précipitée. — La précipitation peut être faite directement avec 6 volumes d'alcool à 96° (BLANC). Le précipité floconneux obtenu est après 24 heures de contact desséché dans le vide, redissous dans l'eau de façon à obtenir une concentration de 20/1 par rapport au volume de la culture primitive, et ensuite filtré.

LAUNOY opère quelque peu différemment. Par addition à 250 cc. de culture en bouillon peptone Martin de 2 volumes d'un mélange à parties égales, alcool absolu-éther à 66°, les microbes sont agglomérés en masse visqueuse et séparés du liquide clair auquel on ajoute 2.500 cc. du même mélange alcool-éther. Le très fin précipité brunâtre obtenu, et qu'on ne peut songer à recueillir directement, est séparé par filtration et repris sur le filtre avec 100 à 200 cc. d'eau physiologique légèrement carbonatée. Après filtration sur bougie la solution est répartie dans des tubes que l'on scelle à la lampe et conserve à la glacière. On obtient ainsi par cette méthode des solutions concentrées de protéase, très actives sous un petit volume, solutions mères que l'on dilue ensuite.

2° Emploi des filtrats. — Ce sont là des opérations longues et compliquées. Dans la plupart des cas on emploiera tout simplement les cultures totales filtrées sur bougie L³ (pression négative de 40 cm. de Hg., température 18 à 20°).

Les cultures totales, donnant approximativement la neutralité au tournesol, sont filtrées telles qu'elles. Cette réaction qui est celle

que le ferment demande pour agir est aussi celle qui convient le mieux à la filtration.

En cas de forte alcalinité, ce qui arrive parfois avec de vieilles cultures de *Proteus* et de *M. prodigiosus*, on neutralisera avec HCl N/100. Il n'y a pas lieu de diluer les filtrats qui sont d'une assez bonne conservation à l'abri de la lumière et à basse température.

Détermination de l'unité gélatinolytique. — Ainsi donc fixé sur l'échantillon à étudier, les conditions à réaliser pour obtenir des protéases actives, leur mode de préparation, nous en sommes tout naturellement conduit à préciser leur valeur fermentaire. D'une façon générale les diastases microbiennes étudiées se sont montrées d'une activité bien inférieure à celle de la trypsine et il n'existe pas de parallélisme étroit entre ces deux actions. Il est impossible de renfermer dans le même cadre l'unité gélatinolytique et l'unité tryptique précédemment définie. Dans le cas de la protéase, la dissolution du test (2 cc. gélatine à 10 % dialysée) a lieu le plus souvent dans une durée de temps bien inférieure à 1 heure, pour une acidité totale acquise après 18 h. à 41° égale à 1 cc. 2-1 cc. 3 Na OH N/10. De même, l'hydrolyse totale du test, très ralentie après quelques heures d'action, est souvent moitié moindre après 18 heures pour une unité gélatinolytique répondant au premier caractère de l'unité tryptique. La nécessité cependant de pouvoir rapporter à une commune mesure l'action de la trypsine et celle des protéases bactériennes apparaît des plus clairement. Des deux caractéristiques auxquelles répond notre unité tryptique, nous ne retiendrons, à propos des protéases, que la première ; l'opinion généralement admise que, dans les actions fermentaires, les phénomènes du début de l'action sont les plus importants, l'ignorance d'autre part dans laquelle nous sommes relativement à la nature exacte des produits de l'hydrolyse résultant de l'action des protéases microbiennes sur la gélatine, la non identité démontrée par SOERENSEN de l'action du formol avec tous les amino-acides, et de ce fait, la valeur tout à fait relative que revêt l'acidité totale, autant de constatations fort judicieusement faites avant nous par LAUNOY (¹⁵⁷), nous ont incité à prendre aussi comme "*unité gélatinolytique*", la plus petite quantité de protéase filtrée ou même de culture vivante capable de provoquer en une heure à 41° la liquéfaction de 2 cc. de gélatine dialysée à 10 %.

CHAPITRE II

I. - Action des sérums normaux.

Les précédents auteurs: MORESCHI, HATA, BERTIAU, BLANC, ont conclu, d'une façon générale, à une inhibition des protéases bactériennes par les sérums. Pour HATA cette inhibition ne serait pas absolue et BLANC ne l'aurait vérifiée que pour la gélatinase du *B. sporogenes*, le sérum se montrant, quelle que soit la dose, sans action sur le ferment du *B. histolyticus*.

Il semble, et cela rend compte dans une certaine mesure, comme nous le verrons dans la suite, de certaines particularités notées par divers auteurs, que dans cette étude il importe encore une fois avant toute chose de définir parfaitement les conditions expérimentales dans lesquelles on se place. Il nous paraît impossible, et ce serait là s'entraîner à de grosses erreurs, de vouloir condenser, dans le cadre étroit d'une seule formule, avec les simples faits en la possession desquels nous sommes à l'heure actuelle, des actions de cette sensibilité et où portent tant de facteurs. La durée d'action du ferment, la quantité de sérum qui lui est opposée, la nature même de la protéase et du sérum, sont des éléments dont nos devanciers, dans leur hâte de conclure, ne semblent pas avoir suffisamment tenu compte. On conçoit ainsi toute la réserve avec laquelle on doit accueillir les conclusions d'auteurs (HATA, BERTIAU) qui par surcroît nous renseignent imparfaitement sur l'activité enzymatique des protéases par eux employées. L'usage d'unités fermentaires trop faibles n'est pas non plus sans influencer les résultats d'expériences qui ne paraissent pas de plus, dans certains cas, avoir été poussées assez longtemps (MORESCHI).

D'une étude plus systématique de la question, qui a été serrée de très près par LAUNOY, il résulte d'abord que le *pouvoir empêchant*

du sérum sur les ferments microbiens est loin d'être comparable, en intensité et en durée, à celui exercé sur la trypsine. En aucun cas il n'y a inhibition ; l'action antagoniste sur les protéases est faible. Ce sont là du moins les résultats auxquels LAUNOY a été conduit en ce qui concerne les protéases du *B. pyocyaneus*, du *M. prodigiosus*, du *Proteus*, du *Vibrien cholérique* et qu'il nous a été donné de confirmer. Il y a lieu, et la question ne peut qu'en gagner en précision et en clarté, de scinder les conclusions en deux parties. Selon la durée de l'action envisagée et la quantité de sérum en présence, on est amené à des résultats qui expliquent l'opposition apparente de nos constatations et de celles des précédents expérimentateurs.

a) Dans des expériences de courte durée (1 heure), et pour de petites doses de sérum, l'affaiblissement de la protéase est manifeste. Cet affaiblissement est différent selon la protéase pour un sérum donné et pour une protéase déterminée selon le sérum. Dans les cas où cette action ne se traduit pas (exemple de BLANC avec le *B. histolyticus*), l'extrême puissance de la gélatinase doit seule être mise en cause.

Les chiffres du tableau ci-dessous (Tableau 4), sont en rapport avec ceux qui mesurent le seuil de l'action antitryptique des sérums envisagés.

Espèces Microbiennes	Unité gélati- nolytique	Homme	Lapin	Cheval
<i>Proteus M.</i>	0,6	{ 0,001 0,002 }	0,004	{ 0,0005 0,001 }
<i>M. Prodigiosus</i> . . .	0,3	0,002	0,002	0,003
<i>B. Pyocyaneus</i> Huv. .	0,1	0,002	0,003	{ 0,0005 0,001 }
<i>V. Cholérique</i> (Zarizin).	0,25	0,0005	0,002	0,002

Tableau 4

b) Il n'en est pas de même si l'on prolonge la durée des expériences. Dans ce cas, l'action d'une quantité de sérum (0 cc. 05), suffisante pour arrêter l'hydrolyse tryptique, ne se traduit ici que par un retard dans la digestion de la gélatine : la protéolyse est seulement ralentie. Il n'y a donc pas "d'optimum approché" et à fortiori "d'optimum réel".

Quel que soit le volume de sérum employé, l'unité de test est toujours complètement liquéfiée en 18 heures à 41°. (A partir même

d'une certaine dose de sérum (0 cc. 1), on voit souvent ce dernier favoriser l'action protéasique).

Nous résumons dans le tableau suivant la valeur maximum de l'affaiblissement de l'activité fermentaire des protéases, sous l'action des sérums de Cheval, Homme, Lapin (par ordre d'action empêchante). Il va sans dire qu'on ne devra attribuer à ces chiffres qu'une valeur représentative tout à fait approchée (la valeur de la protéase est faite égale à 1), les graphiques, que nous ne pouvons malheureusement tous reproduire ici, demeurant seuls capables de traduire avec une netteté parfaite la marche de ce ralentissement. Nous nous contenterons de donner plus loin le graphique de l'action comparative d'un sérum normal et d'un sérum spécifique de Lapin sur l'unité gélatinolytique d'un filtrat de *Proteus M.* (Graphique 7 p. 100).

Unités gélatinolytiques	Homme		Cheval		Lapin	
	Protéase affaiblie de :	Sérum nécessaire à cet affaiblissement	Protéase affaiblie de :	Sérum nécessaire à cet affaiblissement	Protéase affaiblie de :	Sérum nécessaire à cet affaiblissement
B. Pyocyaneus	2/3	0cc07	2/3	0cc01	1/2	0cc05
M. Prodigiosus	1/2	0cc04	2/3	0cc04	1/2	0cc17
Proteus M.	1/3	0cc13	1/2	0cc07	1/4	0cc14
Vibrio cholérique	1/4	0cc02	1/2	0cc08	1/2	0cc12

Tableau 5

II. - Action des sérums préparés.

Sérums antiprotéasiques.

Action contre les protéases antigènes correspondantes.

Cette faible action antiprotéasique des sérums peut être singulièrement renforcée par immunisation : tous les précédents auteurs s'accordent sur ce point. Le protocole de la préparation de sérums antiprotéasiques ayant été longuement relaté dans tous ses détails par LAUNOY, nous ne rapporterons ici que les directives essentielles.

L'immunisation que l'on peut réaliser, soit au moyen de la protéase, soit plus simplement avec le filtrat de la culture, a lieu par la voie sous-

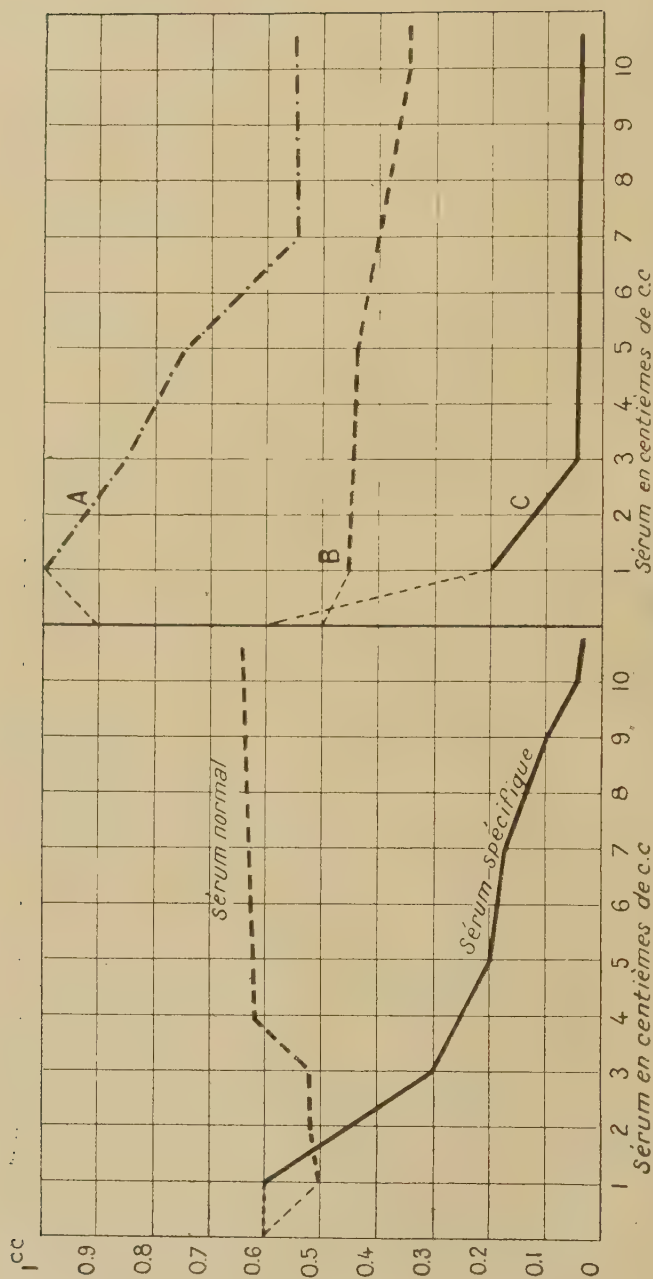
cutanée. (Il ne serait pas sans intérêt de la tenter par d'autres voies). Les injections au nombre de 4 ou 5, à doses croissantes (de 1 à 10 cc. de filtrat dont on détermine l'unité gélatinolytique) sont pratiquées à des intervalles de 3 ou 4 jours et l'animal (Lapin) saigné en moyenne 5 jours après la dernière injection. Il est noté en général, avec un léger amaigrissement de l'animal, l'apparition d'un œdème plus ou moins volumineux, plus ou moins dur, plus ou moins persistant, selon la protéase injectée (*B. pyocyaneus*, *Proteus*, *M. prodigosus*, *Vibrion cholérique*).

Les sérums préparés comparés, au " seuil " de l'action avec les sérums normaux, se révèlent de 5 à 20 fois plus actifs, et alors que ces derniers ne se montrent, dans des actions de plus longue durée, que très légèrement dépresseurs, les sérums préparés sont nettement inhibiteurs pour la protéase antigène. Les observations de K. MEYER (¹⁷⁸) sur le *B. pyocyaneus* et le *M. prodigosus*, BERTIAU sur le *B. pyocyaneus* et le *B. subtilis*, DOCHEZ (⁶¹) sur le *M. lanceolatus*, FRANCIS BLAKE (²⁴) sur le *M. lanceolatus* et le *Staphylococcus pyogenes aureus*, BLANC sur le *B. sporogenes* et le *B. histolyticus*, sont des plus concluantes à cet égard. Les expériences plus récentes de BLANC méritent tout particulièrement d'être rapprochées de celles de LAUNOY (¹⁵⁶) et des nôtres. L'exemple qu'il donne du *B. histolyticus* est des plus probants à ce sujet. Alors que le sérum normal de Cheval, à quelque dose que ce soit (0 cc. 01-2 cc.), est sans action sur le filtrat de *B. histolyticus*, le sérum d'un animal préparé contre cette protéase en ralentit l'action à la dose de 0 cc. 0005 et l'inhibe totalement à la dose de 0 cc. 002.

Le tableau suivant et le graphique 7 rendent compte de cet accroissement que nous avons pu vérifier avec le sérum de Lapin chez les espèces suivantes.

Filtrats	Sérum Lapin normal	Sérum Lapin préparé
B. PYOCYANEUS.	Seuil : 0 cc. 002 Optimum réel : pas d'opt.	Seuil : 0 cc. 0005 - 0 cc. 0007 Optimum réel : 0 cc. 03
PROTEUS M.	Seuil : 0 cc. 004 Optimum réel : pas d'opt.	Seuil : 0 cc. 0002 Optimum réel : 0 cc. 07-0 cc. 1
M. PRODIGIOSUS.	Seuil : 0 cc. 002 Optimum réel : pas d'opt.	Seuil : 0 cc. 0002 Optimum réel : 0 cc. 2
V. CHOLÉRIQUE.	Seuil : 0 cc. 002 Optimum réel : pas d'opt.	Seuil : 0 cc. 0007 - 0 cc. 0008 Optimum réel : 0 cc. 1

Tableau 6



Graphique 7.— Action comparative d'un sérum normal et d'un sérum spécifique de Lapin sur l'unité gélatinolytique d'un filtrat de *Proteus M*.

Graphique 8.— Action d'un sérum de Lapin immunisé contre le protéase du *B. pyocyaneus* sur A) l'unité gélatinolytique de *M. prodigiosus*. B) — — — de *Proteus M*. C) — — — de la souche antigène.

CHAPITRE III

§ I. — *Spécificité des antiprotéases*

L'action antifermentaire des sérums ainsi parfaitement établie vis-à-vis de la protéase antigène, nous en venons tout naturellement à la considérer s'exerçant dans un champ plus vaste dont il va s'agir d'en déterminer les limites. Nous abordons ainsi la question de la spécificité des antiprotéases, spécificité que nous envisagerons d'abord en dehors de l'espèce et dans l'espèce même.

a) Spécificité en dehors de l'espèce. — Si l'on fait agir les divers sérums antiprotéasiques mentionnés précédemment sur des unités gélatinolytiques provenant d'espèces autres que celle de la bactérie antigène, l'inhibition n'est réalisée que vis-à-vis de la protéase antigène (*Graphique 8*). L'action d'un sérum anti non spécifique est comparable à celle du sérum normal. C'est là un point sur lequel s'accordent tous les auteurs, VON DUNGERN, MORESCHI, HATA, K. MEYER, BLANC, LAUNOY et sur lequel il ne semble pas qu'il y ait lieu de revenir.

b) Spécificité dans l'espèce antigène. — Ainsi donc les sérums antiprotéasiques bactériens sont étroitement spécifiques. Mais cette spécificité dans quel cadre joue-t-elle ? Est-elle restreinte à la protéase de la souche antigène, s'applique-t-elle à un certain nombre de variétés de cette souche ou s'étend-elle à tous les germes d'une même espèce ? Est-ce en un mot une spécificité de variété, de groupe ou de race, question de la plus haute importance pour le développement qui va suivre, et dont la solution a enrichi la bactériologie d'un procédé nouveau de diagnose des espèces microbiennes.

LAUNOY (¹⁵⁸) a nettement démontré pour, le *B. pyocyaneus* entre autres, que cette spécificité s'étend à toutes les races et variétés contenues dans l'espèce. Son choix s'est porté tout naturellement sur

ce bacille que tout désignait pour une étude de ce genre. Les nombreux types de germes pyocyaniques, tous reliés entre eux par la production de pyocyanine, mais se différenciant nettement les uns des autres par leurs productions pigmentaires variées, se prêtaient parfaitement à la détermination des limites de l'action d'un sérum antiprotéasique sur la protéase de ce bacille.

Le sérum antiprotéasique employé par LAUNOY résultait de l'injection de filtrats de *B. pyocyaneus* Huv. Essayé sur 26 échantillons divers de *B. pyocyaneus*, il s'est montré à 2 exceptions près (les 2 échantillons réfractaires ne pouvant en raison de leur dégradation pigmentaire et de leur faible activité protéasique infirmer la valeur des autres résultats) très empêchant pour 24 échantillons.

L'action inhibitrice du sérum s'étend donc ainsi à toute les races et variétés de l'espèce. L'identité des protéases dans une espèce donnée s'affirme par cela même comme une propriété fondamentale dont on peut - (NICOLLE (¹⁹⁵)) - déjà entrevoir toute l'importance pratique.

§ II. — *Réaction de l'antiprotéase. -- Importance et valeur de cette réaction*

L'inhibition constante et bien définie ainsi exercée par les sérums préparés sur les protéases de l'espèce antigène, a suggéré à LAUNOY (¹⁵⁸) l'idée de faire intervenir cette réaction d'ordre biologique dans l'identification des bactéries protéolytiques. Le fait pour deux germes microbiens de réagir positivement au même sérum antiprotéasique, implique par cela même une indiscutable parenté de race et constitue la base de cette réaction. (Par réaction positive nous entendons l'arrêt, provoqué par le sérum, de la protéolyse exercée par la bactérie, et la gélification du test d'épreuve (gélatine) dans les limites que nous allons définir). Devant tout l'intérêt que présente une réaction de cet ordre, susceptible d'intervenir dans la diagnose d'un germe microbien alors que seule subsiste au cours de sa dégradation la propriété de sécréter la protéase, il nous a paru utile de reprendre cette question

en l'illustrant d'un plus grand nombre d'expériences lesquelles sont venues confirmer tout ce que nous étions en droit d'attendre de cette nouvelle méthode.

Nos recherches ont porté sur le *B. pyocyaneus* principalement et sur le *Proteus* que des circonstances tout à fait fortuites nous incitèrent à étudier à ce point de vue.

a) Identification de germes pyocyaniques

B. pyocyaniques ; Pyocyanoïdes. — La mise en évidence de la fonction si particulière qu'est la fonction pyocyanogène est à la base de l'identification des germes pyocyaniques. On ne saurait en effet trouver de caractère plus spécifique que la production d'un pigment aux réactions aussi nettes que la pyocyanine. Le milieu d'épreuve (gélose-peptone-glycérine) constitué par GESSARD est particulièrement sensible à son apparition, souvent masquée, dans les cultures en bouillon ou en eau peptonée, par la présence de pigments secondaires (variétés mélanogène, érythrogène).

A côté de ces souches si parfaitement identifiables au moyen des seules colorations qu'elles font apparaître dans ces divers milieux (bouillon, eau peptonée, gélose-peptone-glycérine) il existe des bacilles chez lesquels cette propriété chromogène fondamentale ne peut être décelée, mais dont la parenté pyocyanique ne saurait cependant être mise en doute en raison d'une autre propriété toute particulière et celle-là bien spécifique de l'espèce.

L'identité de leur protéase à la protéase pyocyanique, nettement affirmée par la réaction de l'antiprotéase que nous allons exposer en détails, nous renseigne de la façon la plus affirmative sur cette origine. Ce sont ces germes, ainsi dégradés au point de ne faire de pyocyanine dans aucun des milieux précédemment mentionnés, qu'il convient de dénommer "*pyocyanoïdes*". Cette appellation, proposée par GESSARD (⁸⁸), en rendant compte de l'abolition de cette fonction pyocyanogène si caractéristique, évoque en même temps l'étroite parenté de race que nous avons démontrée.

Il nous a été donné d'étudier quelques échantillons de ces bacilles ainsi dégénérés au point de vue pigmentaire et qui néanmoins avaient conservé intact leur pouvoir gélatinolytique : les uns avaient été dégradés volontairement par M. GESSARD à la suite de cultures en

milieux variés au contact de l'air : les autres parvenus à son laboratoire provenaient de suppurations diverses (pus d'une ostéomyélite entre autres). Qu'ils aient été expérimentalement ou naturellement dégradés, la forme des cultures, l'odeur aromatique et une vague fluorescence en bouillon étaient les seuls vestiges qui subsistaient des propriétés originelles, données bien imprécises et d'ordre tout à fait secondaire, tout juste bonnes à orienter des recherches mais insuffisantes pour étayer sérieusement un diagnostic. La réaction de l'antiprotéase était la seule qu'il était possible de faire intervenir en la circonstance pour nous fixer sur leur identité.

Les échantillons qui nous ont été fournis aux fins d'identification (^{65bis}) par M. GESSARD auquel nous adressons ici tous nos remerciements étaient numérotés *E. Py. M. Sl. PPL. 0₂. 5₇. V. V₂. V₃. V₄. 627₄*.

1° Détermination des unités gélatinolytiques. — Au cours de ces expériences, il a été fait usage de cultures vivantes centrifugées dont la *plus petite quantité capable de provoquer en 1 heure à 41° la dissolution de 2 cc. de gélatine à 10 % dialysée*, a constitué l'*unité gélatinolytique* des diverses souches. Les temps de culture en bouillon tant à l'étuve à 37° qu'à la température du laboratoire ont varié selon les souches, d'activité protéasique inégale. La moyenne pour l'ensemble des germes a été de 8 jours à l'étuve à 37° et 4 jours à la température du laboratoire. L'unité gélatinolytique a oscillé entre 0 cc. 1 et 0 cc. 5, quantité que nous n'avons pas cru devoir dépasser (pour *Sl. M. Bl.*, tout au moins qui se montrèrent peu protéolytiques) afin de ne pas trop charger en germes les réactions ultérieures.

2° Titrage des sérums. — **Détermination de leur pouvoir antiprotéasique par rapport à des filtrats Huv et Hubl d'activité protéolytique éprouvée.** — Les filtrats provenaient de souches *Huv* et *Hubl* rigoureusement identifiées et dataient de 10 à 15 mois. Conservés à la glacière, il se sont montrés actifs aux environs de 0 cc. 2. Les sérums étaient des sérums de Lapins immunisés par des filtrats de souche *Huv* et *Hubl*. (4 à 5 injections sous-cutanées espacées de 3 ou 4 jours, saignée de l'animal 5 jours après la dernière injection). Leur préparation remontait à plusieurs mois. Le temps nous a paru, ainsi que le démontrent les essais qui suivent, en affaiblir quelque peu l'activité. Alors que l' "*optimum réel*" mesuré sur le sérum jeune

se plaçait aux environs de 0 cc. 03, il s'est trouvé reporté, après un an environ, vers 0 cc. 1. Nos réactions qui n'en ont pas moins été d'une netteté parfaite, n'en demeurent que plus concluantes. Des quantités variables de sérum de 0 cc. 05 à 0 cc. 2, furent éprouvées à l'égard des unités gélatinolytiques des filtrats *Huv* et *Hubl*. Après 18 heures d'étuve à 41° on a noté le temps de gel dans un bain à 20°. *La plus faible quantité de sérum susceptible d'empêcher la dissolution du test par le filtrat dans les limites indiquées, et de provoquer sa gélification en 10 minutes, est celle que nous avons fait intervenir dans la réaction d'identification proprement dite*, et que l'on doit, d'une façon plus générale, mettre en présence de l'unité gélatinolytique des bactéries à classer.

3° Réaction proprement dite. — Identification des germes. — Ces opérations préliminaires accomplies, ces titrages ayant été rigoureusement effectués avec toute l'asepsie nécessaire, les cultures à identifier ont été éprouvées à l'égard des sérums. Nous avons cru intéressant de faire les essais sur des quantités de sérum variant de 0 cc. 05 à 0 cc. 3. L'essai avec 0 cc. 1 est le seul qui doive nous guider dans la lecture des résultats, puisque c'est la valeur du pouvoir antiprotéasique de nos sérums.

Nous consignons dans un tableau d'ensemble (p. 106) cette dernière réaction et les conclusions auxquelles nous avons été conduit.

Doivent être considérées comme positives, les réactions qui donnent une gélification du test en 10 minutes dans un bain à 20° après 18 h. d'étuve à 41°, les témoins filtrats accusant une liquéfaction complète et persistante.

Dans cette réaction, comme d'ailleurs dans le titrage des sérums, le test gélatine ne doit être ajouté qu'après un certain temps de contact à la température du laboratoire entre le mélange (sérum + protéase + eau physiologique q. s. p. 1 cc) de façon à favoriser les phénomènes d'adhésion, contact qu'il paraît inutile de prolonger au-delà d'une dizaine de minutes.

Nous voyons ainsi que 7 souches, vis-à-vis desquelles les immuns sérums ont exercé leur action inhibitrice, doivent être classées au nombre des variétés de l'espèce pyocyanique à laquelle elles appartiennent indiscutablement. Les autres *Sl. PPL. V₃. V₄. 627₄* ne sauraient être cataloguées dans cette catégorie, et sont à rejeter au nombre des fluorescents banaux.

SOUCHES	E.	Py	PPI.	SI	M.	O ₂	5,7	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	627 _{1,4}
Cultures en bouillon.		8 jours à 37° 5 jours temp. labo.		9 jours 7 jours				8 jours à 37° 4 jours temp. labo.				
	Odeur	Fluorescence	Odeur	Fluorescence	Odeur	Pas de fluorescence	Odeur	Fluorescence	Pas d'odeur	Fluorescence	Pas d'odeur	Fluorescence
Unités gélatinolytiques	0 cc 1	0 cc 2	0 cc 3	0 cc 5	0 cc 5	0 cc 3	0 cc 1	0 cc 5	0 cc 5	0 cc 5	0 cc 5	0 cc 2
TEMPS DE GEL (BAIN A 20°) APRÈS 18 HEURES D'ÉTUVE A 41°												
Sérum anti-Huv.	7'30	9'30	∞	∞	4'45	14'	4'	4'30	3'30	∞	∞	∞
0 cc 1	7'15	7'30	∞	∞	4'30	10'	»	»	»	∞	∞	∞
0 cc 3												
Sérum anti-Hubl.	7'15	9'45	∞	∞	5'	9'	4'	4'30	4'	∞	∞	∞
0 cc 1						6'30	4'	»	4'	∞	∞	13'30
0 cc 2												
0 cc 3	7'	8'30	∞	∞	4'30	3'30	3'30	3'30	3'30	3'30	3'30	3'30
Témoins gélatine.	6'30	6'30	6'30	6'30	5'45	3'30	3'30	3'30	3'30	3'30	3'30	3'30
Témoins filtrats	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
Interprétation des résultats	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—

Place de cette réaction dans la technique d'identification et de classification des germes pyocyaniques.

La réaction de l'antiprotéase nous a ainsi permis d'étendre, pour le *B. pyocyaneus* du moins, la notion d'espèce au-delà des limites jusqu'alors établies. On ne saurait sous peine d'être incomplet et inexact, en faire abstraction dans une technique générale d'identification et de classification de ces germes.

En raison de sa constante vérification chez toutes les variétés de l'espèce, et de son absolue spécificité, cette réaction pourrait trouver sa place en tête d'une technique de recherche et être instituée d'emblée. Le plus souvent elle ne viendra que plus tard : on n'y aura recours que quand la propriété chromogène n'aura pu être mise en évidence par les milieux institués à cet effet par GESSARD (⁸⁹). Il est, nous l'avons vu, des germes chez lesquels la fonction pyocyanogène, que nous considérons toujours comme fondamentale de l'espèce en raison des propriétés caractéristiques du principe chimique cristallisable qu'est la pyocyanine, peut rester totalement méconnue même à l'égard de la gélose peptonée glycinée. Ce milieu, particulièrement favorable à la production de pyocyanine et que l'on fait intervenir quand les essais précédents en bouillon et eau peptonée n'ont pas résolu la notion espèce, est celui qui est à expérimenter le premier quand il s'agit d'établir la nature pyocyanique d'un germe. Il ne saurait cependant rejeter irrémédiablement, au nombre des simples fluorescents, un bacille qui ne donne pas de bleu de pyocyanine en aucun milieu. C'est alors là qu'il y a lieu, avant de se prononcer définitivement, de faire appel à la réaction de l'antiprotéase.

Si un sérum préparé avec une variété quelconque de la race pyocyanique empêche l'action liquéfiante sur la gélatine du germe suspect, on devra le classer au nombre des bacilles de race pyocyanique en lui réservant, pour les raisons indiquées précédemment, l'appellation plus particulière de "*pyocyanoïde*".

D'une réalisation assez facile et d'une grande sensibilité, cette réaction de l'antiprotéase est susceptible d'intervenir pour classer une bactérie protéolytique à l'étude quand les autres éléments habituels de diagnostic sont imprécis ou font défaut. Nous n'en voulons encore pour exemple que le cas qui nous a été tout dernièrement soumis.

b) Identification de variétés de *Proteus*

Il s'agissait, en la circonstance, de deux germes dont la présence avait été révélée à l'autopsie par MM. BOUFFANAIS et CESARI chez deux animaux de laboratoire (Cobaye et Lapin) morts d'infection spontanée, dont la cause ne pouvait être rapportée qu'à la présence de ces deux bacilles.

Les auteurs obtinrent sur gélose à partir du cerveau, des cultures pures de bactéries gélatinolytiques qui, par l'ensemble de leurs caractères morphologiques et de leurs propriétés biologiques, semblaient se rattacher au *Proteus*. L'habitat un peu particulier dans le cas présent, d'un microbe qu'on est plutôt appelé à rencontrer dans le contenu intestinal ou à la surface de muqueuses altérées et de suppurations putrides, pouvait rendre le diagnostic un peu hésitant. D'un autre côté, bien qu'à l'heure actuelle, depuis les travaux de BERTHELOT (1913) la question du Gram chez le *Proteus* semble parfaitement résolue dans un sens négatif, on ne pouvait pas, en la circonstance, ne point se rappeler combien longtemps restèrent partagées à ce sujet les opinions des bactériologistes. Le fait, pour les deux germes envisagés, de ne pas prendre le Gram en militant très fortement en faveur de leur rattachement à cette espèce pouvait donc ne pas être considéré en soi comme un argument des plus décisifs. Pour ces deux raisons, nous avons été incité à vérifier au moyen de la réaction de l'antiprotéase une parenté que l'on pouvait seulement présumer par ailleurs et qui s'est trouvée des plus nettement confirmée.

Les germes numérotés C (germe provenant du Cobaye) et B (germe provenant du Lapin) se sont révélés très protéolytiques, surtout B.

Leurs unités gélatinolytiques déterminées en même temps que celles de souches de *Proteus* X.₁₉ et M. (cette dernière s'étant révélée très peu protéolytique a du être complètement abandonnée) ont été respectivement éprouvées vis-à-vis d'un sérum de Lapin préparé contre la protéase du *Proteus* M. Ce sérum antiproteus, dont la préparation remontait à un an, s'est montré aussi nettement inhibiteur pour les protéases des deux germes que pour celle de X.₁₉. Il ne nous a pas paru inutile, afin de rendre plus comparables nos résultats, de constituer en plus du témoin sérum de Lapin normal, un témoin

sérum anti-Huv datant de la même époque que notre sérum antiproteus. Pas plus l'un que l'autre, ces sérums ne se sont montrés empêchants sur X_{19} , B et C, attestant ainsi avec la dernière évidence de la spécificité de l'inhibition réalisée par le sérum antiproteus sur les protéases mentionnées.

S O U C H E S		Proteurs X ₁₉	Souche B.		Souche C.		
Temps de culture en bouillon			12 jours à 37°				
			2 » à température laboratoire				
Unités gélatinolytiques (1)			<u>0cc3</u>	<u>0cc1</u>	<u>0cc3</u>	<u>0cc1</u>	<u>0cc3</u>
Sérum antiproteus M.	{	0cc1	6'45	8'	9'30	7'	9'
		0cc3	6'45	6'		6'45	
Sérum anti-Huv.	{	0cc1	∞	∞	∞	∞	∞
		0cc3	∞	∞	∞	∞	
Sérum Lapin normal	{	0cc1	∞	∞	∞	∞	∞
		0cc3	∞	∞	∞	∞	
Témoins :							
gélatine.		5'45					
sérums		5'45					
protéases			∞	∞	∞	∞	∞

Tableau 8

(1) Les unités gélatinolytiques sont les valeurs soulignées. Les souches B et C s'étant montrées beaucoup plus protéolytiques que X_{19} nous indiquons sur ce tableau les temps de gel avec 0cc1 de ces deux protéases.

CHAPITRE IV

Propriétés des sérums antiprotéasiques.

Antiprotéases et antitrypsine.

Antiprotéases et agglutinines.

Antiprotéases et précipitines.

L'inhibition que les immuns sérums exercent sur les fonctions diastasiques des bactéries est des plus intéressantes. CHARRIN (1890) et GHEORGHIOWSKY (⁹⁰) (1899) ont noté que le sérum de Cobaye et de Lapin immunisés contre le *B. pyocyaneus*, en empêchant ce bacille de peptoniser l'albumine, entravait l'élaboration du pigment. C'est au pouvoir antifermentaire du sérum antipneumococcique qu'il convient aussi d'après DOCHEZ (⁶¹) (1916) de rattacher l'arrêt réalisé, à des degrés variés, par ce sérum sur le développement des pneumocoques ; cet arrêt est en effet corrélatif d'une diminution de l'activité des fonctions protéolytique et glycolytique de ces microorganismes. La formation d'une capsule représenterait, selon cet auteur, de la part de l'organisme microbien, un essai de protection de la zone digestive dont l'intégrité est indispensable aux processus nutritifs qui s'exercent aux points de contact de la cellule bactérienne et du milieu environnant. Ces propriétés, englobées par les expérimentateurs anglais et américains dans l'expression " antiblastic immunity " ne seraient pas sans jouer ainsi un rôle important dans la résistance aux infections dues aux pneumocoques. L'action empêchante que le sérum antistaphylococcique manifeste sur la liquéfaction de la gélatine par le *Staphylococcus pyogenes aureus* relèverait de phénomènes du même ordre.

Les sérums antiprotéasiques d'immunisation, dont nous venons de préciser toute la valeur en matière de diagnostic bactériologique, exercent sur l'unité tryptique une action de l'ordre de celle produite par les sérums normaux. Ils possèdent en outre des propriétés agglutinantes et précipitantes marquées. Nous avons noté en effet après

LAUNOY la présence constante d'agglutinines et de précipitines dans le sérum de Lapins préparés par injections de filtrats de *B. pyocyaneus*, *V. cholérique*, *Proteus*. Le tableau suivant (Tableau 9) est particulièrement démonstratif à cet égard.

LAPINS PRÉPARÉS

ANTIGÈNE	PROPRIÉTÉS DES SÉRUMS				
	Agglutinines		Précipitines		Antiprotéases
	Huv	Hubl	Huv	Hubl	
B. Pyocyaneus					
Filtrat Huv.	1/500	0	1/100	1/5	Optimum : 0.03
— —	1/200	0	1/50	0	0.09
V. Cholérique					
Filtrat Z	1/200		1/25		Optimum : 0.1
Proteus					
Filtrat M	M	X ₁₉			Optimum : 0.07
—	1/1000	0			
	1/500	0			0.06

Tableau 9

Le sérum de Lapin normal n'agglutine aucun de ces germes microbiens.

L'action antiprotéasique, quoique le prétende F. BLAKE ⁽²⁴⁾ n'est pas liée cependant à la présence des agglutinines et vraisemblablement pas à celle des précipitines, comme on le verra ci-dessous (Tableau 10). En effet, nous avons pu vérifier le fait démontré par LAUNOY et LEVY BRUHL ⁽¹⁶⁰⁾, qu'au cours d'une infection expérimentale le sérum de l'animal infecté, *toujours agglutinant* pour la bactérie antigène, et parfois nettement précipitant pour sa toxine, n'est *nullement empêchant pour la protéase de celle-ci* ; c'est du moins ce que nous avons établi chez des Lapins infectés de *B. pyocyaneus*, *Proteus* et *V. cholérique*. Les phénomènes observés, qu'il s'agisse du gel ou de l'acidité acquise, sont en tous points comparables à ceux que donne le sérum normal. Aucune action antiprotéasique n'a pu être observée même avec 1/2, 1/4, 1/8^e d'unité gélatinolytique, qu'il s'agisse de filtrats ou de cultures vivantes.

C'est la protéase de la variété infectante qui est intervenue dans la recherche du pouvoir antiprotéasique ; le pouvoir agglutinant a été mesuré sur des émulsions bactériennes de la variété utilisée à l'infection et de variétés voisines, et le pouvoir précipitant pratiqué sur des filtrats de cultures en bouillon Martin des mêmes variétés.

LAPINS INFECTÉS

Microbe antigène	Quantité injectée	Durée des observations	Perte de poids	PROPRIÉTÉS DU SÉRUM					
				Agglutinines		Précipitines		Antiprotéases	
				Huv	Hubl	Huv	Hubl	Huv	Hubl
B. <i>Pyocyaneus</i>	Huv.	1/2 gélose	8 jours	665 gr.	1/500	1/100	1/100	1/5	0
	Hubl.	»	23 »		1/100	1/500	1/5	1/5	0
V. Cholérique Z.	2 géloses	37 jours	240 gr.		1/1000		1/5		0
Proteus X ₁₉				M	X ₁₉				
	1/4 gélose	27 jours		1/50	1/1000				0
	1/3 »	27 »	340 gr.	1/200	1/2000				0

Tableau 10 \

Les expériences relatées dans le précédent tableau nous permettent de conclure avec LAUNOY que dans l'infection expérimentale, le sérum de l'animal ne se montre nullement inhibiteur, la présence de précipitines et d'agglutinines n'entraînant pas forcément l'existence d'antiprotéases. Ce caractère très particulier, qui sépare à ce point de vue les sérums d'animaux immunisés avec les filtrats, des sérums d'animaux infectés, est à rapprocher, en ce qui concerne tout au moins le *B. pyocyaneus*, d'un fait signalé par A. WASSERMANN, à savoir : l'absence d'antitoxine dans le sérum des animaux infectés expérimentalement par ce bacille alors que le sérum des animaux préparés par les cultures se montre très nettement antitoxique.

La production d'antiprotéases ne paraît ainsi, au moins pour les espèces bactériennes étudiées, être une réaction d'infection. A ce point de vue encore les antiprotéases se distinguent nettement des agglutinines. Nous avons déjà précédemment opposé à l'étroite spécificité du pouvoir agglutinant, l'action plus vaste des antiprotéases dans le domaine de l'espèce, caractère des plus importants sur lequel repose toute une méthode d'identification dont les pages précédentes en ont été l'illustration.

CONCLUSIONS

2° — Le sérum sanguin manifeste à l'égard des ferments normaux de l'organisme (présure, pepsine, trypsine), une action empêchante des plus nettes. L'action antitryptique en particulier affecte une constance remarquable: elle peut être considérée, chez l'Homme, comme une véritable constante physiologique.

L'action antidiastasique du sérum paraît être le résultat d'une immunité naturelle; cette immunisation naturelle n'a pas lieu de nous étonner maintenant que nous connaissons la possibilité d'immuniser rapidement des animaux au moyen de *l'ingestion* d'antigènes appropriés.

Le processus intime de l'action antidiastasique, et antitryptique en particulier, nous échappe; il est vraisemblablement le résultat d'une interaction de colloïdes dans laquelle les éléments protéïques du sérum, en particulier la sérum-albumine, jouent un rôle principal.

2° — Le titrage de l'activité antidiastasique, l'étude des réactions de ce pouvoir, nécessitent l'emploi de méthodes rigoureuses susceptibles de fournir des résultats toujours comparables à eux-mêmes; la méthode de L. LAUNOY répond aux desiderata ci-dessus.

En ce qui concerne l'étude du pouvoir antitryptique, nous avons employé cette méthode dans nos recherches personnelles.

3° — Le sérum sanguin exerce également une certaine action empêchante sur les ferments étrangers à l'organisme: laccase, tyrosinase, protéases bactériennes.

Cette action est d'ailleurs faible: elle se traduit par un simple ralentissement de l'activité sans qu'il y ait jamais d'inhibition; elle est très différente de l'action exercée par le sérum sanguin sur les ferments normaux de l'organisme.

4° — A la suite d'injections répétées de diastases étrangères, on arrive à créer chez les animaux injectés, une immunisation active contre ces ferments. Cette immunisation se traduit «in vitro» par l'action inhibitrice sur les ferments, elle a lieu dans un sens étroitement spécifique.

L'injection de ferments normaux dans un organisme animal renforce légèrement, de façon inconstante d'ailleurs, l'action inhibitrice naturelle.

5° — Par l'ensemble de leurs propriétés physico-chimiques (thermolabilité, non dialysabilité), par leur rattachement à la fraction protéique du sérum, les antidiastases se rapprochent des antitoxines : la spécificité de l'action antifermentaire d'immunisation appuie cette hypothèse.

6° — Au cours de processus pathologiques, le pouvoir antiprotéolytique du sérum peut varier ; cette variation est surtout nette dans les cas de suppurations fermées et d'affections néoplasiques.

Nous avons constaté que les affections cancéreuses s'accompagnaient toujours d'un indice antitryptique élevé ; souvent cet indice est au-dessus de la normale. Néanmoins, nous pensons qu'on ne saurait accorder à cette réaction une valeur diagnostique trop absolue.

7° — Nous avons constaté que, au cours du choc anaphylactique foudroyant, il n'y a pas de modification sensible du titre antitryptique du sérum. Cette conclusion infirme la théorie de l'intoxication autoprotytique dans le choc.

8° — La spécificité des antiferments d'immunisation conduit à des résultats pratiques du plus haut intérêt.

En effet, par l'application de sérum spécifique, il est possible de faire la distinction entre les diastases dont les actions sont apparemment identiques ; par exemple distinction d'une protéase bactérienne et d'une trypsine ; distinction d'un lab végétal (cynarase) et d'une présure.

D'autre part, cette réaction sérique acquiert une importance particulière en tant que méthode de diagnostic bactériologique. Elle a permis de reconnaître à côté des *Bacilles pyocyaniques* proprement dits, l'existence de tout un groupe de microbes qui sont maintenant désignés sous le nom de *Bacilles pyocyanoïdes* (GESSARD) ; nous avons contribué à apporter des faits nouveaux confirmant la conclusion ci-dessus. Nous avons de plus montré que cette même réaction pouvait s'appliquer à l'identification de souches de bacilles *Proteus*. Il n'est pas hasardeux de dire que la réaction de l'antiprotéase peut s'appliquer à la diagnose de toutes les espèces bactériennes à fonction protéasique caractérisée ; son emploi dans le diagnostic du *Vibron cholérique* paraît en particulier tout indiqué : il y aurait intérêt à faire cette étude.

9° — La réaction de l'antiprotéase qui est spécifique de toutes les races et variétés d'une espèce s'écarte nettement de la réaction de l'agglutination. L'action antiprotéasique existe sans qu'il y ait de réaction d'agglutination. Contrairement à la formation des agglutinines qui sont les témoins d'une infection, les antiprotéases sont uniquement des réactions d'immunisation, mais non forcément des réactions d'infection.

10° — Au point de vue philosophique, la démonstration que, dans une espèce donnée tous les germes de cette espèce, quelles que soient les modifications morphologiques de ces germes par rapport au germe type, secrètent une même diastase, constitue un nouveau critérium de l'Espèce.

De ce point de vue, il est possible d'ailleurs que la spécificité des antiferments soit surtout une spécificité de support plutôt qu'une véritable spécificité du ferment ; mais, comme dans l'état actuel de la Science nous ne pouvons pas séparer le ferment de son support, il n'en reste pas moins nettement établi que la réaction antidiastasique est un critérium de l'Espèce.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,
Signé : H. COUTIÈRE.

Vu :

Le Doyen de la Faculté,
H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
P. APPELL.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- (1) **Abderhalden et Gigon.** — *Zeitsch. f. Physiol. Chem.*, 1907, t. LV, p. 251.
- (2) **Achalme.** — *Annales Institut Pasteur*, 1901, t. XV, p. 737.
- (3) **Achalme et Stevenin.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1911, p.p. 333 et 480.
- (4) **Adler.** — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1909, t. III, p. 447.
- (5) **Ambard.** — *Semaine médicale*, 1908, n° 45, p. 532.
- (6) **Ando.** — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1913, t. XVIII, p. 1.
- (7) **Ascoli et Bezzola.** — *Centr. f. Bakt., Orig.*, 1903, t. XXXIII, p. 783.
- (8) — — — *Berl. Klin. Woch.*, 1903, t. XL, p. 391.
- (9) — — — *Giorn. della R. Soc. Ital. d'Igiene*, 1903, t. XXV, p. 121.
- (10) **Baer (Julius).** — *Arch. f. exp. Path. u. Therapie*, 1906, t. LXI, p. 68.
- (11) **Balteano.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1914, n° 5, p. 208.
- (12) **Bauer.** — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1910, t. V, p. 186.
- (13) **Bayliss.** — *Arch. Soc. Biol.*, 1904, t. XI (suppl.), p. 261.
- (14) **Bayliss et Starling.** — *Journ. of Physiol.*, 1905, t. XXXII, p. 129.
- (15) **Becker.** — *Bioch. Centralblatt*, 1908, p. 860.
- (16) — — — *Berl. Klin. Woch.*, 1909, t. XLVI, p. 1016.
- (17) — — — *Münch. Med. Woch.*, 1909, n° 27, p. 1363.
- (18) **Bergmann (von).** — *Zeitsch. f. exp. Pathol.*, 1906, t. III, p. 401.
- (19) **Bergmann (von) et Bamberg.** — *Berl. Klin. Woch.*, 1908, t. XLV, p. 1396.
- (20) **Bergmann (von) et Meyer.** — *Berl. Klin. Woch.*, t. XLV, p. 1673.
- (21) **Bernbach.** — *Centr. f. Bakt., Orig.*, 1908, t. XLV, p. 355.
- (22) **Bertiau.** — *Centr. f. Bakt., Orig.*, 1914, t. 74, p. 374.
- (23) **Bittorf.** — *Deutsch. Arch. f. Klin. Med.*, 1909, t. XCI.
- (24) **Blake F.** — *Journ. of exp. Med.*, 1917, v. XVI, p. 565.
- (25) **Blanc.** — *Thèse Doct. Med. Paris*, 1921.
- (26) **Bordet et Gengou.** — *Annales Institut Pasteur*, 1901, t. XV, p. 129.
- (27) **Braunstein.** — *Deut. Med. Woch.*, 1909, n° 13, p. 573.
- (28) — — — *Berl. Klin. Woch.*, 1910, n° 11, p. 478.
- (29) **Braunstein et Kepinow.** — *Bioch. Zeitsch.*, 1910, t. XXVII, p. 170.

- (30) **Brieger.** — *Mediz. Klinik*, 1909, n° 14, p. 496.
- (31) — — *Berl. Klin. Woch.*, 1910, n° 7.
- (32) **Brieger et Trébing.** — *Berl. Klin. Woch.*, 1908, n° 22, p. 1041 et 1349.
- (33) — — *Berl. Klin. Woch.*, 1908, n° 51, p. 2260.
- (34) **Briot.** — *C. R. Acad. Sc.*, 29 mai 1899.
- (35) — — *Thèse Doct. es-Sciences*, 1900.
- (36) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1902, t. LIV, p. 140.
- (37) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1914, t. LXXXVI, p. 153.
- (38) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1914, t. LXXXVII, p. 160.
- (39) **Camus et Gley.** — *Arch. de Physiol.*, 1897, t. IX, p. 764.
- (40) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1897, t. IX, p. 825.
- (41) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1900, t. LII, p. 106.
- (42) **Cantacuzène et Jonescu Mihaiesti.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1908, t. LXV, p. 271.
- (43) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1908, t. LXV, p. 273.
- (44) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1909, t. LXVI, p. 53.
- (45) **Carnot, Gérard et M^{lle} Moissonnier.** — *Annales Institut Pasteur*, 1921, t. XXXV, p. 1.
- (46) **Carpi.** — *Bioch. Ter. Sper.*, 1909, v. I, p. 403.
- (47) **Cathcart.** — *Journ. of Physiol.*, 1904, t. XXXI, p. 497.
- (48) **Charrin.** — *Les défenses naturelles de l'organisme*, 1898 p. 130.
- (49) **Charrin et Levaditi.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1900, t. LII, p. 83.
- (50) **Chiarolanza.** — *Med. Naturwissenschaft Arch.*, 1908, t. II, p. 44.
- (51) **Citronblatt.** — *Med. Klinik*, 1912, n° 34, p. 1388.
- (52) **Cobliner.** — *Bioch. Zeitsch.*, 1910, t. XXV, p. 494.
- (52) — — *Bioch. Zeitsch.*, 1910, t. XXV, p. 494.
- (53) **Corsini Fortunato.** — *Atti. R. Accad. Fisio critici*, 218, p. 777.
- (54) **Dastre et Stassano.** — *Arch. Int. de Physiol.*, 1904, t. I, p. 88.
- (55) **Delezenne.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, t. XV, p. 132 et 1036.
- (56) **Delezenne et Pozerski.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, t. LV, p. 327.
- (57) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, t. LV, p. 690 et 693.
- (58) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, t. LV, p. 935; 1905, t. LVIII, p. 560.
- (59) **Döblin.** — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1910, t. IV, p. 224 et 229.
- (60) **Dochez.** — *Journ. of exp. Med.*, 1909, v. II, p. 718.
- (61) — — *Journ. of exp. Med.*, 1916, t. I, p. 61.

- (61^{bis}) **Donath et Landsteiner.** — *Münch. Med. Woch.*, 1904, n° 36, p. 1590.
- (62) **Dungern (von).** — *Münch. Med. Woch.*, 1898, p. 1040.
- (63) **Effront.** — *Les catalyseurs biochimiques*, 1914.
- (64) **Eisner.** — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1909, n° 5.
- (64^{bis}) **Emmerich et Meyer.** — *Deutsch. f. Klin. Med.*, 1909, t. XCVI, p. 287.
- (65) **Eve.** — *Brit. Med. Journ.*, 1910, v. II, p. 1540.
- (65^{bis}) **Falque.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. LXXXV, p. 799.
- (66) **Fermi.** — *Giorn. d. R. Accad. d. Med.*, 1890, nos 1 et 2.
- (67) — — *Centr. f. Bak.*, 1897, t. XXII, n° 1.
- (68) — — *Centr. f. Bak.*, 1909, t. L, n° 2, p. 225.
- (69) — — *Centr. f. Bak.*, orig., 1913, t. LXVIII.
- (70) **Fermi et Pernossi.** — *Arch. f. Hygiene*, 1890, t. X, n° 1.
- (71) — — *Zeitsch. f. Hygiene*, 1894, t. XVIII, p. 83.
- (72) **Fiessinger et Baufle.** — *Revue de médecine*, 10 avril 1910.
- (73) **Finzi.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1909, t. LXVI, p. 1007.
- (74) **Fujimoto.** — *Journ. of Immun.*, 1918, v. 3, p. 51.
- (75) **Fuld.** — *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm.*, 1907, t. LVIII, p. 467.
- (76) **Fuld et Spiro.** *Hoppe Seyler's Zeitsch. f. Physiol. Chem.*, 1900, t. XXXI, p. 132.
- (77) **Furst.** — *Berl. Klin. Woch.*, 1909, n° 2, p. 58.
- (78) **Gaetgens.** — *Centr. f. Bak.*, 1909, t. III, p. 223.
- (79) **Gammeltoft.** — *Meddelelser fra Rigshospitalet*, 1912, Copenhague.
- (80) **Gessard.** — *Annales Institut Pasteur*, 1901, t. XV, p. 593.
- (81) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1902, t. LIV, p. 551; 1911, t. LXXI, p. 591.
- (82) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1902, p. 1398.
- (83) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, p. 227.
- (84) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1906, t. LX, p. 505.
- (85) — — *C. R. Acad. Sciences*, 12 mars 1906.
- (86) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1906, t. LXI, p. 425.
- (87) **Gessard et Wolff.** — *C. R. Acad. Sc.*, 24 février 1908.
- (88) **Gessard.** — *C. R. Acad. Sc.*, 2 février 1920, t. CLXX, p. 298.
- (89) — — *Annales Institut Pasteur*, 1920, t. XXXIV, p. 88.
- (90) **Gheorghiewsky.** — *Annales Institut Pasteur*, 1899, n° 4, p. 298.
- (91) **Glaessner.** — *Bett. f. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1903, t. IV, p. 79.
- (92) — — *Hofmeister's Zeitsch.*, 1904.

- (93) **Golla.** — *Lancet*, 1909, p. 958.
- (94) — — *Britt. med. Journ.*, 1909, p. 1058.
- (95) **Græfenberg.** — *Münch. Med. Woch.*, 1909, t. LVI, p. 702.
- (96) **Gréhant.** — *Arch. de physiologie normale et pathologique*, 1890, t. XXII, p. 133.
- (97) **Gröer** (von). — *Bioch. Zeitsch.*, 1912, t. XXXVIII.
- (98) **Gross.** — *Arch. f. exp. Patbol. u. Pharm.*, 1907, t. LVIII, p. 157.
- (99) **Hahn.** — *Berl. Klin. Woch.*, 1897, n° 23, p. 499.
- (100) **Halban et Landsteiner.** — *Münch. med. Woch.*, 1902, t. IL, p. 473.
- (101) **Hamburger.** — *Journ. of exp. Med.*, 1911, p. 535.
- (102) **Hammarsten.** — *Maly's Jahresbericht*, 1887, t. XVII, p. 160.
- (103) **Hanson.** — *Journ. of Immu.*, 1918, v. III, p. 139.
- (104) **Hata.** — *Cent. f. Baht. Ref.* 34, 1904, p. 208.
- (105) **Hedin.** — *Journ. of Physiol.*, 1905, t. XXII, p. 390.
- (106) **Hedin.** — *Bioch. Journ.*, 1906, t. I, p. 474.
- (107) — — *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1907, t. L, p. 497, et t. LII, p. 412.
- (108) — — *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1908, t. LVII, p. 468.
- (108 bis) **Henri Victor.** — *Semaine médicale*, 4 sept. 1907.
- (109) **Henri Victor et Meyer A.** — *Rev. gén. d. Sc. pures et appliquées*, 1904, 30 nov., 15 et 30 déc.
- (110) **Herzfeld.** — *Berl. Klin. Woch.*, 1908, p. 2182.
- (111) **Hildebrandt.** — *Virchow's Archiv.*, 1890, t. CXXI, p. 1.
- (112) — — *Virchow's Archiv.*, 1893, t. CXXXI, p. 5.
- (113) **Hirata.** — *Bioch., Zeitsch.*, 1910, t. XXVII, p. 397.
- (114) **Hort.** — *Britt. med. Journ.*, 1909, II, p. 966.
- (115) **Iscovesco.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1906-1907.
- (116) **Jacob.** — *Münch. Med. Woch.*, 1909, t. LVI, p. 1361.
- (117) **Jacoby.** — *Bioch. Zeitsch.*, 1906, II, p. 247; 1907, II, p. 144, IV, p. 21 et 471.
- (118) **Javillier.** — *Thèse Pharm. Paris*, 1903.
- (119) **Jobling et Petersen.** — *Journ. of exp. Med.*, 1914, v. IXX, p. 459.
- (120) — — *Journ. of exp. Med.*, 1914, v. XX, p. 37.
- (121) — — *Journ. of exp. Med.*, 1914, v. XX, p. 468.
- (122) **Jobling, Petersen et Eggstein.** — *Journ. of exp. Med.*, 1915, v. XXII, p. 141 et 401.
- (123) — — — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1915, t. XXIV, p. 459.
- (124) — — — *Journ. of exp. Med.*, 1915, v. XXII, p. 129.

- (125) Jobling, Petersen et Eggstein. — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1915, t. XXIV, p. 219.
- (126) — — — *Journ. of exp. Med.*, 1915, v. XXII, p. 568.
- (127) — — — *Journ. of exp. Med.*, 1915, v. XXII, p. 590.
- (128) — — — *Journ. of exp. Med.*, 1915, v. XXII, p. 603.
- (129) — — — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1915, t. XXIII, p. 71.
- (130) Jochmann. — *Virchow's Archiv.*, 1909, t. CXCIV n° 2, p. 342.
- (131) — — *Deut. Med. Woch.*, 1909, n° 43, p. 1869.
- (132) Jochmann et Kantorowicz. — *Münch. Med. Woch.*, 1908, n° 14, p. 728.
- (133) — — — *Zeitsch. f. Klin. Med.*, 1908, t. LXVI, p. 153.
- (134) Kalaboukoff (Mlle) et Terroine. — *C. R. Soc. Biol.*, 1907, t. LXII, 26 oct. et 7 et 14 déc.
- (135) Kämmerer. — *Deut. Arch. f. Klin. Med.*, 1911, v. CIII, p. 341.
- (136) Kämmerer et Aubry. — *Bioch. Zeitsch.*, 1913, t. III, p. 247.
- (137) Kämmerer et Mogulesko. — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1912, p. 16.
- (138) Kantorowicz. — *Münch. Med. Woch.*, 1909, n° 18, p. 897.
- (139) Kawashima. — *Bioch. Zeitsch.*, 1909, t. XXIII, p. 186.
- (140) Kniaszkoff. — *Wratchebnaia Gazeta*, 1911, n° 17.
- (141) Korschun. — *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1902, t. XXXVI, p. 141.
- (142) Krause et Klug. — *Berl. Klin. Woch.*, 1908, n° 31, p. 1454.
- (143) Krym. — *Prakticzski Wratch.*, 1910, n° 50 et 51.
- (144) Kudo. — *Bioch. Zeitsch.*, 1909, t. XV, p. 473.
- (145) Landois. — *Berl. Klin. Woch.*, 1909, n° 10, p. 440.
- (146) Landsteiner. — *Centr. f. Bakt.*, 1900, t. XXVII, p. 357.
- (147) — — — *Centr. f. Bakt.*, 1905, t. XXXVIII, p. 344.
- (148) Larguier des Bancelis. — *C. R. Soc. Biol.*, 1905, p. 130.
- (149) Launoy L. — *Annales Institut Pasteur*, 1909, t. XXIII, p. 1 et 979.
- (150) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1909, p. 975.
- (151) — — *Bulletin Institut Pasteur*, 1911, t. IX, p. 289.
- (152) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1911, p. 367.
- (153) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1918, t. LXXXI, p. 416 et 742.
- (154) — — *Annales Institut Pasteur*, 1919, t. XXXIII, p. 1.
- (155) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1919, t. LXXXII, p. 57.
- (156) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1919, t. LXXXII, p. 263.
- (157) — — *Annales Institut Pasteur*, 1919, t. XXXIII, p. 657.

- (158) **Launoy L.** — *Annales Institut Pasteur*, 1920, t. XXXIV, p. 249.
- (158^{bis}) **Launoy L.** et **S. Debat-Ponsan** (Mme). — *C. R. Soc. Biol.*, 1919, t. LXXXII p. 578.
- (159) **Launoy et Falque.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, t. LXXXVI, p. 102.
- (159^{bis}) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, t. LXXXVI, p. 1067.
- (160) **Launoy L.** et **Lévy-Bruhl.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1919, t. LXXXII, p. 1274.
- (161) **Linossier.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1918, t. LXXXII, p. 422.
- (162) **Lœper et Esmonet.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1908, pages 850, 939 et 996.
- (163) **Lust.** — *Münch. Med. Woch.*, 1909, t. LVI, p. 2047.
- (164) — — *Münch. Med. Woch.*, 1911, p. 2132.
- (165) **Malfitano.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, t. LV, p. 1611.
- (166) **Mandelbaum.** — *Münch. Med. Woch.*, 1909, p. 2215.
- (167) **Marcus.** — *Berl. Klin. Woch.*, 1908, n° 14, p. 689.
- (168) — — *Berl. Klin. Woch.*, 1909, n° 4, p. 156.
- (169) **Marie P.-L.** — *De l'antipepsine Thèse, Paris*, 1913.
- (170) **Matthes.** — *Centr. f. med. Wissensch.*, 1894.
- (171) **Mello Ugo.** — *Recueil de Méd. vétérinaire*, 1909, p. 563.
- (172) **Mesnil.** — *Annales Institut Pasteur*, 1901, p. 352.
- (173) — — *Annales Institut Pasteur*, 1902, t. XVI.
- (174) **Mesnil et Mouton.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, t. LV, p. 1019.
- (175) **Meyer Kurt.** — *Berl. Klin. Woch.*, 1909, n° 23, p. 1064,
- (176) — — *Berl. Klin. Woch.*, 1909, n° 42
- (177) — — *Bioch. Zeitsch.*, 1910, t. XXIII, p. 68.
- (178) — — *Bioch. Zeitsch.*, 1911, t. XXXII, p. 274.
- (179) — — *Bioch. Zeitsch.*, 1912, p. 125.
- (180) — — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1913, t. IXX, pages 179 et 485.
- (181) **Miesowicz et Maciag.** — *Int. Beitr. z. Pathol. u. Ther. d. Ernährungsstörungen*, fév. 1910.
- (182) **Mintz.** — *Russki Wratch.*, 1910, p. 379.
- (183) — — *Folia Serologica*, 1911, v. VI, p. 279.
- (184) **Moll.** — *Hofmeister's Beitr.*, 1902, t. II, p. 344.
- (185) **Moreschi.** — *Giorn. d. R. Soc. Ital. d'Ig.*, 1903, n° 4, analysé dans *Centr. f. Bakt. Ref.* 35, 1904, p. 96.
- (186) **Morgenroth.** — *Centr. f. Bakt. u. Parasit.*, 1899, t. XXVI, p. 349.
- (187) — — *Centr. f. Bakt. u. Parasit.*, 1900, t. XXVII, p. 720.
- (188) — — *Berl. Klin. Woch.*, 1909, t. XLVI, p. 758.

- (189) **Moro.** — *Centr. f. Bakt.*, 1904, t. XXXVII, p. 485.
- (190) **Müller.** — *Deut. Arch. f. klin. Med.*, 1908, t. XCI, nos 3 et 4.
- (191) **Müller et Jochmann.** — *Verhandlungen d. Kongresses f. innere Med., Wiesbaden, 1907.*
- (192) **Müller.** — *Münch. Med. Woch.*, 1907, n° 8, p. 354.
- (193) **Neisser et Königsfeld.** — *Zeitsch. f. klin. Med.*, 1911, p. 444.
- (194) **Neumann.** — *Berl. Klin. Woch.*, 1908, n° 46.
- (195) **Nicolle.** — *Les antigènes et les anticorps*, 1920, p. 46.
- (196) **Oguro.** — *Biocb. Zeitsch.*, 1909, t. XXII, p. 266.
- (197) **Opie.** — *Journ. of. exp., Med.*, 1905, t. VII.
- (198) **Opie et Barker.** — *Journ. of. exp. Med.*, 1907, t. IX, p. 207.
- (199) **Opie, Barker et Dochez.** — *Journ. of. exp. Med.*, 1911, t. XIII, p. 162.
- (200) **Oppenheimer et Aron.** — *Berl. Zeitsch. f. chem. Physiol.*, 1903, t. IV, p. 279.
- (201) **Perin.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1902, t. LIV, p. 938.
- (202) **Pfeiffer.** — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1913, t. IXX, p. 470.
- (203) **Pfeiffer et de Crinis.** — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1913, t. XVIII, p. 93.
- (204) **Pick et Pribram.** — *Handbuch d. Technik u. Methodik d. Immunitätsforschung von Kraus et Levaditi*, t. II, p. 84.
- (205) **Poggenpohl.** — *C. R. Acad. Med.*, 29 juin 1909, rapport de **Widal**.
- (206) — — *Arch. med. exp. et anat. pathol.*, nov. 1909.
- (207) — — *Russkij Wratch.*, 1909, n° 29, p. 814.
- (208) **Pugliese.** — *Pflüger Archiv.*, 1898, v. LXIX, p. 115.
- (209) **Pugliese et Coggi.** — *Bull. del. Soc. med. chir. di Bologna*, 1897, t. VIII, p. 63.
- (210) **Purgesz.** — *Ärtzliche Fachsitzungen des Erdelyer Museumvereines*, mars 1910.
- (211) **Rabinowitch.** — *Praktisches Wratch.*, 1910, n° 40, p. 640.
- (212) **Remedi et Bolognesi.** — *Arch. ital. de Biol.*, 1911, t. LVI, p. 187.
- (213) — — *Centr. f. Biol.*, 1912, t. XIII, p. 770.
- (214) **Reuss.** — *Wiener. Klin. Woch.*, 1909, t. XXII, p. 1171.
- (215) **Reyman.** — *Journ. of Immun.*, 1920, v. IV.
- (216) **Robertson B. et Hanson S.** — *Journ. of Immun.*, 1918, v. III, p. 131.
- (217) **Roche.** — *The Arch. Int. Med.*, 1909, p. 249.
- (218) **Röden.** — *Upsalas Lakareförentings förhandlingar*, 1887, t. XXII, p. 546, analysé dans *Schmidt's Jahrbücher*, 1887, t. CCXVI, p. 115.
- (219) **Rondoni.** — *Berl. Klin. Woch.*, 1910, n° 12, p. 529.
- (220) — — *Lo Sperimentale*, 1910, t. XIV, p. 1.
- (221) — — *Arch. ital. de Biol.*, 1911, p. 231.

- (222) **Rosenthal.** — *Folia Serologica*, 1910, t. VI, p. 285.
- (223) — — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1913, t. IX, p. 477.
- (224) **Roux J.-Ch.** et **Savignac.** — *Arch. malad. app. digestif et nutrition*, 1910.
- (225) **Rubinstein.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1911, t. LXXI, p. 116.
- (226) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1912, t. LXXII, p. 23.
- (227) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1912, t. LXXII, p. 365.
- (228) — — *Annales Institut Pasteur*, 1913, t. XXVII, p. 1074.
- (229) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1918, p. 511.
- (229 bis) — — *Traité pratique de Sérologie et de Séro-diagnostic*, 1921, pages 92 et 350.
- (230) **Rubinstein et Girault.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1913, t. LXXIII, p. 205.
- (231) **Rusznayak.** — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1911, t. X, p. 135.
- (232) — — *Deut. Med. Woch.*, 1912, n° 4, p. 168.
- (233) — — *Zeitsch. f. Immunitätsforschung, I. Orig.*, 1920, t. XXX, p. 1.
- (234) **Sachs.** — *Fortschritte d. Med.*, 1902, t. XX, p. 425.
- (235) **Schippers.** — *Deut. Arch. f. klin. Med.*, 1911, t. CI, p. 543.
- (236) **Schlecht.** — *Münch. Med. Woch.*, 1908, n° 14.
- (237) **Schlecht et Wiens.** — *Centr. f. inn. Med.*, 1909, n° 12.
- (238) **Schnappauf.** — *Thèse, Rostock*, 1888.
- (239) **Schnappaut et Nasse**, cité par **Dastre et Stassano.** — *Arch. Int. Physiol.*, 1904, t. I, p. 88.
- (240) **Schorlemmer et Selter.** — *Zeitsch. f. klin. Med.*, 1909, t. LXIX, p. 153.
- (241) **Schultz, Werner et Chiarolanza.** — *Deut. Med. Woch.*, 1908, n° 30.
- (242) **Schutze et Bergell.** — *Zeitsch. f. klin. Med.*, 1907, t. LXI, p. 366.
- (243) **Schwarz O.** — *Beitr. z. chem. Physiol.*, 1905, t. VI, p. 524.
- (244) — — *Wiener klin. Med.*, 1909, n° 33, p. 1151.
- (245) — — *Berl. Klin. Woch.*, 1909, n° 48.
- (246) **Sellier.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, t. LV, p. 1019.
- (247) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1905, p. 628.
- (248) **Slavtsoff.** — *Russki Wratch.*, 1910, t. IX, p. 364.
- (249) **Soërensen.** — *C. R. Lab. Carlsberg*, 1907, t. VII, p. 1.
- (250) **Stern et Eppenstein.** — *Münch. Med. Woch.*, 1906, p. 2192.
- (251) **Stevenin.** — *Thèse Paris*, 1911.
- (252) **Teale et Bach.** — *Proc. Roy. Soc. Med. London*, 1920, v. XIII, p. 5.
- (253) — — *Proc. Roy. Soc. Med. London*, 1920, v. XIII, p. 43.

- (254) **Teale et Embleton.** — *Lancet*, 1913, p. 236.
- (255) **Thaler.** — *Wiener Klin. Woch.*, 1909.
- (256) — — *Gynäk. Rundschau*, 1909, n° 8.
- (257) **Velde** (van de). — *Bioch. Zeitsch.*, 1909, t. XVIII, p. 142.
- (258) **Vaughan.** — *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 1914, t. LXII, p. 583.
- (259) **Vernon.** — *Amer. Journ. of Physiol.*, 1901, t. XXVI, p. 405.
- (260) — — *Journ. of Physiol.*, 1904, p. 346.
- (261) **Wohlard.** — *Münch. Med. Woch.*, 1907, n° 9 p. 403.
- (262) **Wæle** (H. de). — *Centr. f. Bakt. I. Orig.*, 1909, t. L, p. 40.
- (263) **Wæle** (H. de) et van de **Velde.** — *Centr. f. Bakt., Orig.*, 1905, t. XXXIX, p. 353.
- (264) **Wago.** — *Journ. of Immun.*, 1919, v. IV, p. 19.
- (265) **Walters.** — *Journ. Biol. Chem.*, 1912, t. XII, p. 43.
- (266) **Wansey Bayly** (Hugh). — *Brit. Med. Journ.*, 1909, p. 1220.
- (267) **Weil R.** — *Arch. of Int. Med. Chicago*, 1910.
- (268) — — *Journ. of Amer. Assoc.*, 1910, v. LII.
- (269) **Weil E.** et **Braun.** — *Wiener Klin. Woch.*, 1908, p. 650.
- (270) **Weinberg.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1909, p. 433.
- (271) — — *II^e Conférence intern. pour l'étude du cancer*, 1910, p. 43.
- (272) **Weinberg et Gilbert.** — *Traité du sang*, 1921, t. II, pages 300 et 626.
- (273) **Weinberg et Laroche.** — *C. R. Soc. Biol.*, 23 octobre 1909.
- (274) **Weinberg et Mello.** — *C. R. Soc. Biol.*, 30 octobre 1909.
- (275) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1910, p. 441.
- (276) **Weinberg et Rubinstein.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1911, t. LXXI, p. 228.
- (277) — — *C. R. S. Biol.*, 1912, t. LVII, p. 718.
- (278) **Weinland.** — *Zeitsch. f. Biol.*, 1903, t. XLIV, pages 1 et 45.
- (279) **Welsch.** — *Arch. Int. de Physiol.*, 1908, t. VII, fasc. 2.
- (280) **Widal et Poggenpohl.** — *C. R. Acad. Med.*, 29 juin 1909.
- (281) **Wiens.** — *Deut. Arch. f. klin. Med.*, 1907, v. XCI, p. 456.
- (282) — — *Münch. Med. Woch.*, 1907, n° 53.
- (283) — — *Centr. f. inn. Med.*, 1908, n° 31.
- (284) **Wiens et Schlecht.** — *Centr. f. inn. Med.*, 1908, n° 31.
- (285) — — *Deut. Arch. f. klin. Med.*, 1909, t. XCVI, p. 44.
- (286) **Wohlgemuth.** — *Bioch. Zeitsch.*, 1900, t. II, p. 264.
- (287) **Wolf.** — *Münch. Med. Woch.*, 1910, p. 1353.

- (288) **Wright.** — *Lancet*, 1917, p. 6, et *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1917, t. X, p. 1.
(289) **Young.** — *The biob. Journ.*, 1918, v. XII, p. 499.
(290) **Zlatogorow et Scheremezinskaia.** — *Wratchebnaia Gazeta*, 1912, n° 4.
(291) **Zunz.** — *Bull. Acad. Roy. Med. Belgique*, 1905, t. IXX, p. 729.
(292) — — *Mémoires couronnés Acad. Roy. Med. Belgique*, 1909, t. XX, fasc. 5.
(293) — — *C. R. Soc. Biol.*, 1918, p. 461.
(294) **Zunz et Goværts.** — *C. R. Soc. Biol.*, 1918, p. 146.
(295) **Zunz et Mayer.** — *Bull. Acad. Roy. Med. Belgique*, 1905, p. 509.
-

Imprimerie DANZIG
26, rue des Francs-Bourgeois
PARIS (3^e)